

Untersuchungen zur Funktion von MutL γ und MutS γ in humaner DNA-Mismatch-Reparatur.

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Lennart Matthias Rösner
aus Hannover

1. Referentin oder Referent:
2. Referentin oder Referent:
eingereicht am:
mündliche Prüfung (Disputation) am:

Privatdozent Dr. Gerhard Gross
Professor Dr. Norbert F. Käufer
20.12.2010
08.04.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Rösner, L.M., Mielke, C., Merkhoffer, Y., Fährlich, S., Drexler, H.G. und Dirks, W.G. (2010). Human MutL γ is not able to activate G2/M checkpoint (Poster). 11th Biennial Meeting of the DGDR / German Society for Research on DNA Repair, Jena.

Rösner, L.M., Mielke, C., Drexler, H.G., Dittmar, K.E.D. und Dirks, W.G. (2009) A novel role of meiotic MLH3 in mitotic MMR (Poster). 2nd German-French DNA Repair Meeting, Konstanz.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Entstehung von DNA-Schäden.....	1
1.2 Reparatur von DNA-Schäden.....	3
1.3 Reparatur von DNA-Fehlern: Mismatch-Reparatur (MMR).....	6
1.3.1 Mechanismus der MMR.....	6
1.3.2 Mikrosatelliteninstabilität (MSI).....	9
1.3.3 Instabilität codierender Mikrosatelliten.....	10
1.3.4 MMR-Beteiligung an der Auslösung von Apoptose nach DNA Schäden.....	11
1.3.5 Beteiligung von MMR-Proteinen an der Meiose.....	12
1.3.6 Homologien von MutL-Proteinkomplexen.....	13
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Material.....	16
2.2 Bakterienkultur.....	24
2.3. Zellkultur.....	29
2.4 Biochemische Methoden.....	32
2.5 Immunologische Methoden.....	36
2.6 Mikroskopie.....	43
2.6.1 Epifluoreszenzmikroskopie.....	43
2.6.2 Konfokale Mikroskopie.....	43
2.6.3 Live-cell imaging.....	44
2.6.4 UVA-vermittelter DNA-Schaden.....	44
2.7 Einzelzell-Gelelektrophorese (<i>single cell gelelektrophoresis</i> , SCE, Comet Assay).....	46

3. Ergebnisse	48
3.1 Analyse der Proteine MSH4, MSH5 und MLH3 in humanen Zelllinien.....	48
3.2 Analyse der Transkripte von MSH4, MSH5 und MLH3 in humanen Zelllinien.....	49
3.1.1 Transkriptanalyse MSH4 / MSH5	52
3.1.2 Transkriptanalyse MLH3	53
3.2 Expression rekombinanter cDNAs	55
3.3 Untersuchung der rekombinanten Einzelklone	60
3.3.1 Liegt für die rekombinanten Proteine natürliches Bindevverhalten vor?	60
3.3.2 Welche MutL-Heterodimere sind an der DNA-Reparatur beteiligt?	67
3.3.3 Welche MutL-Heterodimere sind an MMR beteiligt?	78
4. Diskussion	86
4.1 Expression von MSH4 und MSH5	87
4.2 Expression von MLH3	88
4.3 Stabile Expression als Werkzeug zur Untersuchung von Reparaturfunktionen	90
4.4 Überprüfung rekombinanter Proteine.....	91
4.4.1 Protein-Protein-Interaktionen und Lokalisation.....	91
4.4.2 Protein-Interaktionen mit nukleären Strukturen.....	93
4.5 MLH3 in der Mitose.....	94
4.6 Antwort auf induzierte DNA-Schäden (DDR).....	94
4.6.1 Akkumulation von MutL α , MutL β und MutL γ am Ort induzierten DNA-Schadens.	95
4.6.2 Akkumulation von MLH3	95
4.6.3 Akkumulation von Deletionsmutanten und Varianten von MLH3	96
4.6.4 Schlussfolgerung der DDR.....	98
4.6.5 Partnerproteine von MLH3	98
4.7 Beteiligung an MMR.....	99
4.8 Abschließende Betrachtung.....	102
Zusammenfassung	103
Literaturverzeichnis.....	104

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1 Fehleranfälligkeit humaner DNA-Polymerasen.....	1
Abb.1.2 Auftreten und Folgen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch den Metabolismus... 2	2
Abb.1.3 Mechanismus der MMR.....	8
Abb.1.4 MMR-Beteiligung an der Auslösung von Apoptose nach DNA Schäden.....	12
Abb.1.5 Sequenzabgleich der humanen MutL-homologen MMR-Proteine.....	14
Abb.2.1 Einstellung übereinstimmender Fokalebene von sichtbaren und ultravioletten Laserlinien mittels Kollimator.....	45
Abb.2.2 Einstellung übereinstimmender Fokalebene von sichtbaren und ultravioletten Laserlinien mittels UVA-induziertem DNA-Schaden.....	46
Abb.3.1 Darstellung der Exonstruktur der Gene MLH3, MSH4 und MSH5.....	50
Abb.3.2 Transkriptanalyse von Tumorzelllinien mit MSI-Status.....	51
Abb.3.3 Transkriptanalyse von Tumorzelllinien mit MSS-Status.....	52
Abb.3.4 Zusammenfassende Darstellung der Transkriptanalyse.....	53
Abb.3.5 Varianten und Deletionsmutanten des Proteins MLH3.....	56
Abb.3.6 Verwendete multicistronische Expressionsvektoren.....	57
Abb.3.7 Einzelexpression rekombinanter MMR-Proteine in Fusion mit Fluoreszenzproteinen.....	61
Abb.3.8 Co-Expression rekombinanter MMR-Proteine in Fusion mit Fluoreszenzproteinen.....	63
Abb.3.9 Nachweis von MLH3-Bindepartnern mittels Affinitätschromatographie.....	65
Abb.3.10 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP).....	67
Abb.3.11 Akkumulation von MutL-Heterodimeren nach UV-Induktion von DNA-Schäden.....	69
Abb.3.12 Kombination aus UV-induziertem DNA-Schaden und FRAP.....	70
Abb.3.13 Akkumulation von GFP-MLH3 nach UV-Induktion von DNA-Schäden in An- und Abwesenheit von MLH1.....	71
Abb.3.14 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines 293T-Einzelklons, welcher unterschiedlich getagte MLH3-Proteine exprimiert.....	73
Abb.3.15 Ausschluss einer Antikörper-Kreuzreaktivität von α GFP und α TagRFP.....	74
Abb.3.16 Co-Immunpräzipitation rekombinanter Proteine des MutL γ -Heterodimers sowie unterschiedlich fluoreszenzfusionierter MLH3-Proteine.....	75
Abb.3.17 Akkumulation von MLH3-Varianten und -Mutanten nach UV-Induktion von DNA- Schäden.....	76

Abb.3.18 Detektion der Fluoreszenz von TagRFP-PCNA und GFP-MLH3 in verschiedenen Stadien der S-Phase.....	79
Abb.3.19 MLH3 akkumuliert an den Centrosomen.....	80
Abb.3.20 Einzelzell-Gelelektrophorese nach Temozolomid-Behandlung.....	82
Abb.3.21 Immunnachweis von γ H2AX nach Temozolomid-Behandlung.....	84
Abb.4.1 Hypothetisches Modell einer Redundanz der MMR-Heterodimere.....	86
Abb.4.2 Sequenzabgleich der N-terminalen Bereiche von MutL-homologen Proteinen.....	97

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	16
Tab. 2.2 Übersicht über die verwendeten Kits.....	18
Tab. 2.3 Übersicht über die verwendeten Enzyme.....	18
Tab. 2.4 Übersicht über die verwendeten Antikörper.....	18
Tab. 2.5 Übersicht über die Verbrauchs- und Glasmaterialien.....	19
Tab. 2.6 Übersicht über die Geräte.....	19
Tab. 2.7 Übersicht über Größenstandards, Nukleotide und Plasmide.....	21
Tab. 2.8 Übersicht über verwendete Primer.....	21
Tab. 2.9 Übersicht über humane Zelllinien.....	22
Tab. 2.10 Übersicht über Zellkulturmedien.....	24
Tab. 2.11: Übersicht über die Basenaustausche in den für die Klonierungen verwendeten cDNAs.....	36
Tab. 2.12 Molekulare Größen der in dieser Arbeit immunologisch untersuchten Proteine...	39
Tab. 2.13 Übersicht über die Absorptions- und Emissionsmaxima eingesetzter Fluoreszenzproteine.....	44
Tab.3.1 Grundlegende Informationen über die zu untersuchenden Gene.....	48
Tab.3.2 Übersicht der Vektorkonstrukte zur stabilen Expression in humanen Zellen.....	58
Tab.4.1 Vorhersage putativer NLS und NES MutL-homologer Proteine und MutSy.....	91

Abkürzungsverzeichnis

6-4PP	Pyrimidin-6-4-Pyrimidon-Photoprodukt
6-Thioguanin	6-Thioguanin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
Ala	Alanin
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Excisionsreparatur
BLM	<i>Bloom's Helicase</i>
bp	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer susceptibility protein</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
CFP	cyan fluoreszierendes Protein, <i>cyan fluorescent protein</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop, <i>confocal laser scanning microscope</i>
CMV	Cytomegalievirus
cMS	codierende Mikrosatelliten
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimer
CRM	<i>chromosome maintenance</i>
CS	Cockayne Syndrom
CSR	<i>class switch recombination</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein, <i>enhanced green fluorescent protein</i>
EME1	<i>essential meiotic endonuclease 1 homolog</i>
ERCC	<i>excision repair cross-complementing</i>
Exo1	Exonuklease 1
FBS	Fötales Rinderserum, <i>fetal bovine serum</i>
FRAP	<i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i>
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein, <i>green fluorescent protein</i>
GGR	transkriptionsunabhängige Reparatur, <i>global genome repair</i>
GHKL	Gyrase, Hsp90, Histidinkinase, MutL-ATPase
Glu	Glutaminsäure
H2AX	Histon 2AX
His	Histidin
HMGB	<i>High mobility group binding protein</i>
HNPCC	hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (<i>hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma</i>)

HR	Homologe Rekombination
ICL	Interstrang-Querverbindung <i>interstrand crosslink</i>
IDL	Insertions-/ Deletionsschleife, <i>insertion/ deletion loop</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	<i>luria broth</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
Lsg.	Lösung
MCR	<i>mutation cluster region</i>
MGMT	O ⁶ -Methylguanin Methyltransferase
MLH	MutL Homolog
Mlh	murines MutL Homolog
MMR	Mismatch-Reparatur
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MRN	Mre11/Rad50/Nbs1
mRNA	Boten-RNA, <i>messenger RNA</i>
MS	Mikrosatellit
MSH	MutS Homolog
Msh	murines MutS Homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
MUS81	<i>MUS81 endonuclease homolog (S. cerevisiae)</i>
NA	Numerische Apertur
NEAS	nichtessentielle Aminosäuren
NER	Nukleotid-Excisionsreparatur
NES	Kernexportsignal, <i>nuclear export signal</i>
NHEJ	<i>nonhomologous ends joining</i>
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLS	Zellkern-Lokalisationssignal, <i>nuclear localization signal</i>
O ⁶ -BG	O ⁶ -Benzylguanin
O ⁶ ^{me} G	O ⁶ -Methylguanin
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen, <i>open reading frame</i>
PAC	Puromycin N-Acetyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PIC	<i>protease inhibitor cocktail</i>
PMS	<i>post-meiotic segregation protein</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RecQ	<i>RecQ protein-like / DNA helicase Q1-like</i>
RFC	<i>replication factor C</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SCE	Einzelzell-Gelelektrophorese, <i>single cell gelelectrophoresis</i>
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
S _N I	nukleophile Substitution mit einem monomolekularen Mechanismus
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSA	<i>single-strand annealing</i>
T	Thymin
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	<i>terrific broth</i>
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur, <i>transcription coupled repair</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TGFBRII	transforming growth factor β receptor II
TMZ	Temozolomid
u	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
UVA	Ultraviolett A
UVB	Ultraviolett B
VBP	<i>van-Hippel-Lindau binding protein</i>
WCE	Lysat ganzer Zellen, <i>whole cell extract</i>
WT	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
XRCC	<i>X-ray repair cross-complementing</i>
Y	Pyrimidin (C oder T)
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

1. Einleitung

1.1 Entstehung von DNA-Schäden

Die DNA aller lebenden Organismen wird ständig durch endogene und exogene Faktoren beschädigt oder verändert. Resultierende Mutationen können die Ursache maligner Tumore sein, daher ist die Aufrechterhaltung der Integrität genomischer DNA eine grundlegende Schlüsselfunktion innerhalb der Zelle.

Unter den bedeutendsten äußeren Einflüssen sind ionisierende Strahlung, UV-Licht, Nahrungstoxine und mutagene chemische Agenzien zu nennen. Als Bestandteil des natürlichen Sonnenlichts ist beispielsweise die energiereiche Strahlung des ultravioletten Spektrums eine ständige Quelle für DNA-Schäden in exponierten Zellen.

Primär sind jedoch zelleigene Prozesse Ursachen für Veränderungen der DNA. Grundsätzlich muss zwischen DNA-Schäden und -Fehlern unterschieden werden. Fehler in der DNA-Sequenz, wie z. B. Fehlpaarungen, können während der Replikation auftreten und sind auf die replikativen DNA-Polymerasen zurückzuführen. Da im menschlichen Körper 10 Millionen Zellteilungen pro Sekunde stattfinden (Marnett und Plastaras 2001), muss die Duplikation eines Genoms mit 3 Milliarden Basenpaaren vor jeder Zellteilung mit einem absoluten Minimum an Fehlern erfolgen. Verschiedene Mechanismen kontrollieren den Replikationsprozess und unterdrücken auf diese Weise die Entstehung von Mutationen. Daher treten DNA-Fehler tatsächlich mit einer Wahrscheinlichkeit von lediglich eins zu zehn Milliarden replizierter Basenpaare auf (Umar und Kunkel 1996; Abb.1).

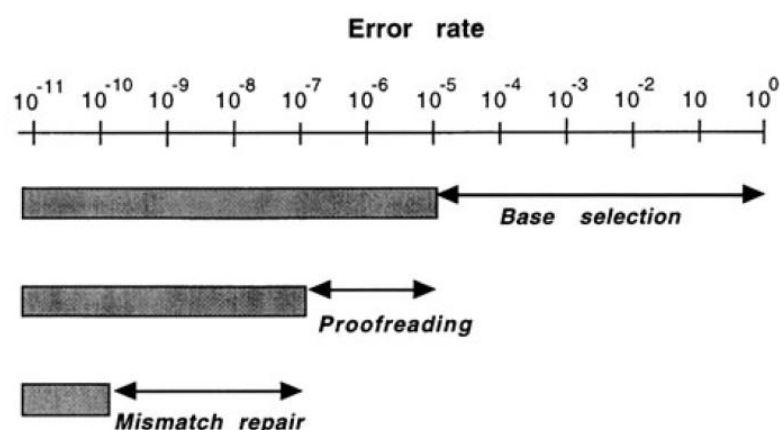


Abb.1.1 Fehleranfälligkeit humaner DNA-Polymerasen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der DNA-Polymerasen eine falsche Base in die DNA einbauen, liegt bei bis zu 1:10.000. Die Genauigkeit humaner Polymerasen wie Pol δ oder Pol ϵ erhöht sich aufgrund der intrinsischen Korrekturlesefunktion um den Faktor 10-100. Darüberhinaus ermöglicht die post-replikative DNA Mismatch-Reparatur eine bis zu 1000fache Erhöhung der Präzision, was während der Replikation zu einer Rate von einem Fehler auf 10^{10} (10 Milliarden) eingebaute Basen führt. Aus: Umar und Kunkel 1996.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die vor allem während des Energiestoffwechselprozesses in der Zelle entstehen, gelten als Hauptursache für DNA-Schäden und führen zu einer Vielzahl von oxidativen Basenschäden, Doppelstrangbrüchen und Einzelstrangbrüchen (de Bont und van Larebeke 2004). Pro Tag entstehen durch den Metabolismus in jeder Zelle 10^9 ROS-Moleküle mit dem Potential, die DNA zu beschädigen. Antioxidantien können diese teilweise abfangen und reduzieren die Zahl der oxidativen DNA-Schäden. Schätzungen gehen von 10^6 pro Tag und Zelle aus (Abb. 2, Pollycove und Feinendegen 2003), die in ca. 50.000 Einzelstrang- und 0,1 Doppelstrangbrüchen pro Tag und Zelle resultieren (de Bont und Larebeke 2004).

Durch exogene Faktoren ausgelöste DNA-Schäden treten wesentlich seltener auf. Beispielsweise entstehen durch die gesamte ionisierende Strahlung von 1 mGy pro Jahr, der ein Mensch ausgesetzt ist, 200 Millionen mal weniger oxidative Schäden und 1000-mal weniger Doppelstrangbrüche pro Tag und Zelle (Abb.2 Werte in Klammern, Pollycove und Feinendegen 2003).

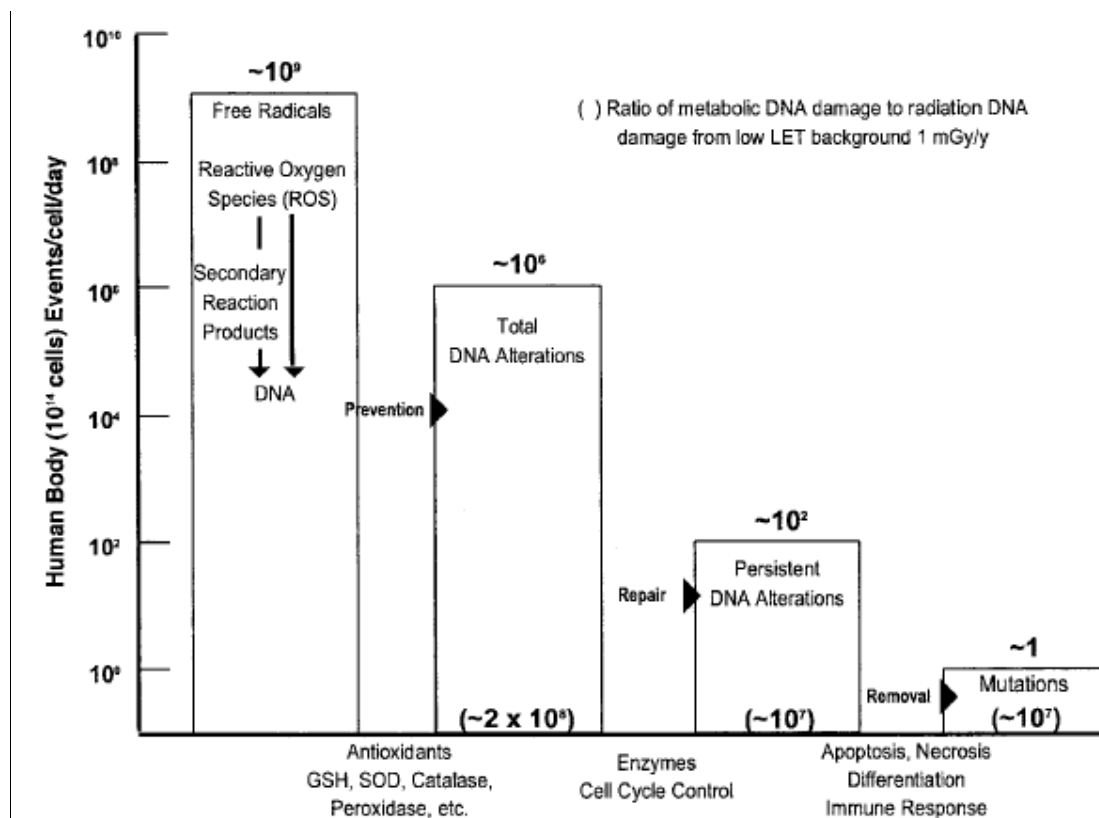


Abb.1.2 Auftreten und Folgen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch den Metabolismus. Die Säulen stellen v.l.n.r. auftretende ROS, Veränderungen der DNA, nicht reparierte, persistierende Veränderungen und manifestierte Mutationen dar. Über den Säulen angegebene Werte zeigen die errechnete Anzahl dieser Ereignisse pro Tag und Zelle eines menschlichen Organismus an. Werte in Klammern repräsentieren das Verhältnis zu einem Auftreten äquivalenter Ereignisse durch ionisierende Strahlung von 1 mGy/Jahr. Aus: Pollycove und Feinendegen 2003.

Hochkonservierte DNA-Reparaturmechanismen der Zelle erkennen und korrigieren spezifisch unterschiedliche Arten von DNA-Läsionen. Darüberhinaus können bestimmte DNA-Schäden Signalkaskaden auslösen, die zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen. Die geringe Anzahl letztendlich entstehender Mutationen ist auf die Funktionen dieser DNA-Reparatursysteme zurückzuführen.

1.2 Reparatur von DNA-Schäden

In Mammaliazellen existieren verschiedene Reparatursysteme, die jeweils bestimmte Arten von DNA-Schäden erkennen. Genetische Defekte in DNA-Reparaturgenen führen zu ernsthaften Krankheitsbildern und belegen die Notwendigkeit erfolgreicher DNA-Reparatur. Im Folgenden werden verschiedene Reparatursysteme erläutert.

Direkte Reparatur

Als direkte Reparatur werden Vorgänge bezeichnet, in denen jeweils nur ein einziges Protein beteiligt ist, welches zur Erkennung und Reparatur eines spezifischen Schadens in der Lage ist. Das Protein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist in einer sich selbst verbrauchenden, direkten Reaktion an der Reparatur alkylierter DNA beteiligt. Dabei wird die Methylgruppe von O⁶-Methylguaninen der DNA auf das Protein übertragen.

Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Das von Bakterien zum Mensch konservierte Prinzip der NER beruht auf dem Ausschneiden kurzer einzelsträngiger Bereiche fehlerhafter DNA (12-13 Nukleotide) durch zweifaches Einschneiden und anschließender Resynthese des Einzelstrangs (Übersicht in Nospikel 2008). Substrate dieses Reparaturmechanismus sind sperrige Läsionen, die zu Schlaufenbildung der DNA-Doppelhelix führen. Darunter werden eine Reihe chemischer Addukte aber auch UV-induzierte Pyrimidin-6-4-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4PPs) und Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs), sowie Interstrang-Querverbindungen (*interstrand crosslinks*, ICLs) von Proteinen der NER detektiert.

Die Schadenserkenkung erfolgt über die XP-Proteinkomplexe XPE und XPC, welche den Transkriptionsfaktor TFIIH rekrutieren. Die Helikasen dieses Multiproteinkomplexes, XPB und XPD, ermöglichen zusammen mit den Kofaktoren XPA und RPA die Entwindung des DNA-Doppelstrangs im Bereich des Schadens. Anschließend erfolgt das Einschneiden des fehlerhaften Strangs durch die Endonukleasen XPG (3') und ERCC1/XPF (5' des Schadens), die Polymerisation des Doppelstrangs durch die Polymerasen δ oder ϵ und die Ligation der

Einzelstrang-Enden durch Ligase1. Ein Untertyp dieser sog. globalen NER (*global genome repair*, GGR) tritt während der Transkription auf (*transcription coupled repair*, TCR). Die Initiation von TCR beruht auf einem Stocken der RNA-Polymerase an einer DNA-Läsion. Diesem Schadenserkenkungssignal folgen die Rekrutierung der CS-Proteine und eine bevorzugte Reparatur des transkribierten Strangs.

Keimbahnmutationen von NER-Genen führen zu dramatischen Krankheitsbildern (de Boer und Hoeijmakers 2000). Ausfall von XP-Genen führt zu einer stark erhöhten Photosensitivität und Hautkrebsanfälligkeit (*Xeroderma pigmentosum*, auch Mondscheinkrankheit). Tritt Defizienz der CS-Gene auf, sind eine Reihe von neuronalen Dysfunktionen sowie Wachstumshemmung die Folge (Cockayne Syndrom). NER kann zu einem bestimmten Teil Funktionen des BER-Systems ausführen und dient daher als Backup-System.

Basenexzisionsreparatur (BER)

Grundlegend werden bei der Basenexzisionsreparatur durch das Zusammenwirken von vier Proteinen eine einzelne (*short-patch* BER) oder mehrere beschädigte Basen (*long-patch* BER) aus der DNA ersetzt (Übersicht in Robertson et al. 2009). Oxidierte, alkylierte, desaminierte Basen, aber auch depurinierter bzw. depyriminierter Stellen der DNA werden durch eine von elf DNA-Glycosylasen erkannt und entfernt.

Bei der *short-patch* BER ist die Endonuklease AP an der Exzision beteiligt, woraufhin der einzelsträngige Bereich durch Polβ komplementiert und mittels Ligase3/XRCC1 ligiert wird. Die *long-patch* BER beruht dagegen auf der Endonuklease FEN1. Die Ligation der in diesem Fall mehreren inserierten Basen wird anschließend durch Ligase1 ermöglicht. Eine Rolle in der Auswahl zwischen *short-* und *long-patch* BER wird für das Strukturprotein XRCC1 diskutiert.

Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Doppelstrangbrüche (DSB) stellen für die genomische Integrität eine besondere Gefahr da, weil sich bei der Reparatur im Gegensatz zu Basen- oder Nukleotidschäden nicht an einem korrekten, direkt benachbarten DNA-Strang orientiert werden kann. Fehlerhafte Reparatur kann zu größeren Deletionen, chromosomalen Translokationen und dem Verlust der Heterozygotie führen, bei der ein Chromosom verloren geht und das verbleibende verdoppelt wird (*loss of heterozygosity*, LOH).

Die Reparatur kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Man unterscheidet die Reparaturprozesse der Homologen Rekombination (HR) und des *Nonhomologous end-joining*

(NHEJ), welche jedoch nicht in Konkurrenz zueinander stehen, sondern über Expression, Phosphorylierung und Verfügbarkeit von Faktoren und homologen Sequenzen reguliert sind (Huertas 2010, Shrivastav et al. 2008). So treten HR und ihre Subtypen ausschließlich in der S-Phase auf, während NHEJ während des gesamten Zellzyklus Doppelstrangbrüche prozessieren kann.

Nonhomologous end-joining (NHEJ)

Das oft als fehleranfällig beschriebene NHEJ ist durchaus in der Lage, Doppelstrangbrüche mit komplementären Überhängen korrekt zu reparieren. Bei mangelnder Komplementarität führt jedoch der Abgleich über sog. Mikrohomologien zu einer Reparatur auf Kosten von Deletionen und Insertionen.

Freie DNA-Enden werden zunächst durch das Ku-Heterodimer (Ku70/Ku80) gebunden. Dies ermöglicht nach Aktivierung der Proteinkinase DNAPK in Verbindung mit dem Artemis-Protein eine Prozessierung der DNA-Enden. Die Ligation der gebundenen Enden erfolgt ohne Sicherstellung, dass diese Enden zueinander gehören, durch den Ligase4/XRCC4-Komplex. Darüberhinaus ist NHEJ auch in der Reparatur physiologisch entstandener DSBs aus der [V(D)J] Rekombination und class switch recombination (CSR) beteiligt (Hartlerode und Scully 2009; Helleday 2010).

Homologe Rekombination

Homologe Rekombination (HR) führt meist zu einer fehlerfreien DNA-Reparatur. Eine Bindung freier Enden an eine unbeschädigte, homologe DNA-Sequenz (entweder auf dem Schwesterchromatid, homologen Chromosomen oder in wiederholten Sequenzabschnitten auf anderen Chromosomen) dient dabei als Ansatzpunkt der Reparatur. Es existieren verschiedene Subtypen der HR, welche sich in folgenden Schritten leicht unterscheiden (DSBR, BIR, SDSA, SSA, s. Huertas 2010; Helleday 2010). Initial verbindet der MRN-Komplex zwei freie DNA-Enden. Da für die Reparatur 3'-Überhänge benötigt werden, folgt eine Prozessierung der DNA-Enden durch den MRN-Komplex in Verbindung mit Proteinkinase ATR, Proteinen der RAD-Familie und den BRCA-Proteinen. RAD51 bindet die entstandenen einzelsträngigen Enden und vermittelt die Invasion dieser in einen entwundenen, homologen DNA-Doppelstrang. Auf Basis der homologen Sequenz werden diese daraufhin verlängert. Treffen auf diese Weise die freien Enden aufeinander, spricht man von einer Holliday-Struktur (*Holliday junction*). Der hybridisierte Bereich kann dann über die sog. Schenkelwanderung (*branch migration*) vergrößert oder verkleinert werden. Nach der

Ligation der Enden erfolgt die Auflösung dieser komplizierten DNA-Struktur, welche vermutlich die Aktivität von Helikase BLM und Topoisomerase III α erfordert, aber auch durch die Endonukleasen MUS81 und EME1 durchgeführt werden könnte (Hartlerode und Scully 2009).

1.3 Reparatur von DNA-Fehlern: Mismatch-Reparatur (MMR)

Der folgende Abschnitt geht näher auf Funktion, Bedeutung und Besonderheiten humaner DNA-Mismatch-Reparatur ein. Vor der Beschreibung des Reparaturprinzips wird die Geschichte der Entdeckung der zugrunde liegenden Mechanismen kurz dargestellt.

Nachdem im Jahre 1913 erstmals ein erhöhtes Vorkommen von Darmkrebs innerhalb einer Familie berichtet wurde (Warthin 1913), beschrieben Henry T. Lynch et al. 1966 eine erbliche Darmkrebsform ohne Polyposis, die zunächst als „Cancer family syndrome“ bezeichnet und später als HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) und Lynch Syndrom bekannt wurde (Lynch und Smyrk 1996). Kennzeichen sind ein frühes Eintreten von Darmkrebs (durchschnittlich im Alter von 45 Jahren, Lynch Syndrom I) sowie erhöhtes Risiko von Tumorigenese der Gebärmutterschleimhaut, der Eierstöcke, des Magens, des Dünndarms, der Niere und der Harnwege (Lynch Syndrom II). Eine seltene Unterform von HNPCC, das Muir-Torre Syndrom, ist durch erhöhtes Risiko für Talgdrüsenadenome gekennzeichnet (Modrich und Lahue 1996).

Die Erforschung der Ursache dieser erblichen Anfälligkeit für Tumore begann mit der Entdeckung, dass HNPCC-Tumore eine Veränderung bestimmter repetitiver Sequenzen im Genom aufweisen (Aaltonen et al. 1993). Diese zunächst als MIN, später als MSI beschriebene Mikrosatelliteninstabilität wurde daraufhin auch in 15 % aller nicht erblich bedingten Darmkrebserkrankungen (Bellizzi und Frankel 2009) und sporadischen Tumoren der Gebärmutterschleimhaut, des Magens, der Eierstöcke, des Gebärmutterhalses, der Bauchspeicheldrüse, der Speiseröhre und der Prostata detektiert (Modrich und Lahue 1996). Diese wird unter 1.2.6.2 genauer erläutert. Veröffentlichungen von Aaltonen et al. 1993 und Peltomäki et al 1993 konnten schließlich diese Prädisposition für Krebserkrankungen mit Defekten im Mismatch-Reparatur-Mechanismus menschlicher Zellen verknüpfen.

1.3.1 Mechanismus der MMR

Die DNA-Mismatch-Reparatur erkennt fehlerhaft eingebaute Nukleotide des DNA-Doppelstrangs. Die Ausbesserung von Replikationsfehlern ähnelt der NER und BER im

Hinblick auf das Einschneiden des fehlerhaften Strangs, die Exzision der Fehler und die Resynthese des Doppelstrangs.

Die Schlüsselproteine des MMR-Systems liegen im humanen System als Heterodimerkomplexe vor. Das humane Homolog des bakteriellen MutS-MMR-Proteins, MSH2, ist in der Lage entweder mit MSH6 oder MSH3 ein Dimer zu bilden, welche daraufhin als MutS α bzw. MutS β bezeichnet werden. Die Proteine MSH4 und MSH5 bilden nach Heterodimerisierung den Komplex MutS γ . Analog zu MSH2 kann das zum bakteriellen MutL homologe MLH1-Protein unterschiedliche Einheiten bilden. Die Heterodimerisierung mit PMS2, PMS1 oder MLH3 führt zu MutL α , MutL β bzw. MutL γ (Abb.3).

Für MutL α konnte gezeigt werden, dass die Heterodimerisierung essentiell hinsichtlich eines Imports in den Zellkern ist. Der Transport erfolgt über nukleare Lokalisationssequenzen (NLS) auf beiden Proteinen, welche erst durch die Bindung demaskiert und damit funktional werden (Wu et al. 2003; Brieger et al. 2005).

Detektion der Fehlpaarung und Strangdiskriminierung

Die Erkennung fehlerhaft eingebauter Nukleotide durch das MMR-System wird durch MutS α und β mit einer gewissen Redundanz zueinander vermittelt. MutS α weist dabei eine höhere Affinität zu Fehlpaarungen von ein oder zwei Nukleotiden auf, während MutS β primär Schlaufenbildungen des Doppelstrangs detektiert, die durch Insertion oder Deletion von bis zu 8 Basen entstehen (IDL, *insertion/deletion loop*, Genschel et al. 1998, Dufner et al. 2000). Die MutS-Komplexe formen dabei unter ATP-Verbrauch eine Klammer um den fehlerhaften DNA-Doppelstrang (Obmolova et al. 2000), was eine Konformationsänderung zur Folge hat (Gradia et al 1997). MutS α und MutS β weisen mehrere Bindestellen für PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) auf. Dieser Homotrimerkomplex bildet einen Ring um die DNA und ist vermutlich an der Initiation der Reparatur beteiligt (Umar et al. 1996b; Flores-Rozas et al. 2000; Kleczkowska et al 2001).

Der Detektion der Fehlpaarung folgt die Rekrutierung des Heterodimers MutL α . Eine intrinsische Endonukleasefunktion der Untereinheit PMS2 ermöglicht das Einschneiden des fehlerhaften DNA-Strangs und bildet Ansatzstellen für die Korrektur. Dieser Prozess ist abhängig von MutS α/β und den Proteinen PCNA und RFC (Replikationsfaktor C; Kadyrov et al. 2006). Um Replikationsfehler zu korrigieren, müssen Einzelstrang-Schnitte (*nicks*) stets im neusynthetisierten Strang erfolgen. Diese Diskriminierung erfolgt über weitere, bereits bestehende *nicks*, welche während der Replikation durch Okazaki-Fragmente (Folgestrang)

oder das Replikations-Ende (Leitstrang und Folgestrang) vorhanden sind. Ungeklärt ist, auf welche Weise die MMR-Komplexe von den Orten der Fehlpaarung mit den bestehenden Einzelstranglücken kommunizieren. Vermutlich erfolgt eine Bewegung des MutS α /MutL α -Komplexes unter ATP-Verbrauch entlang des DNA-Strangs („*signaling along the helix*“). Alternativ könnte durch eine Schlaufenbildung der DNA gleichzeitig Kontakt mit Fehlpaarung und *nick* erfolgen (Übersicht in Li et al. 2008).

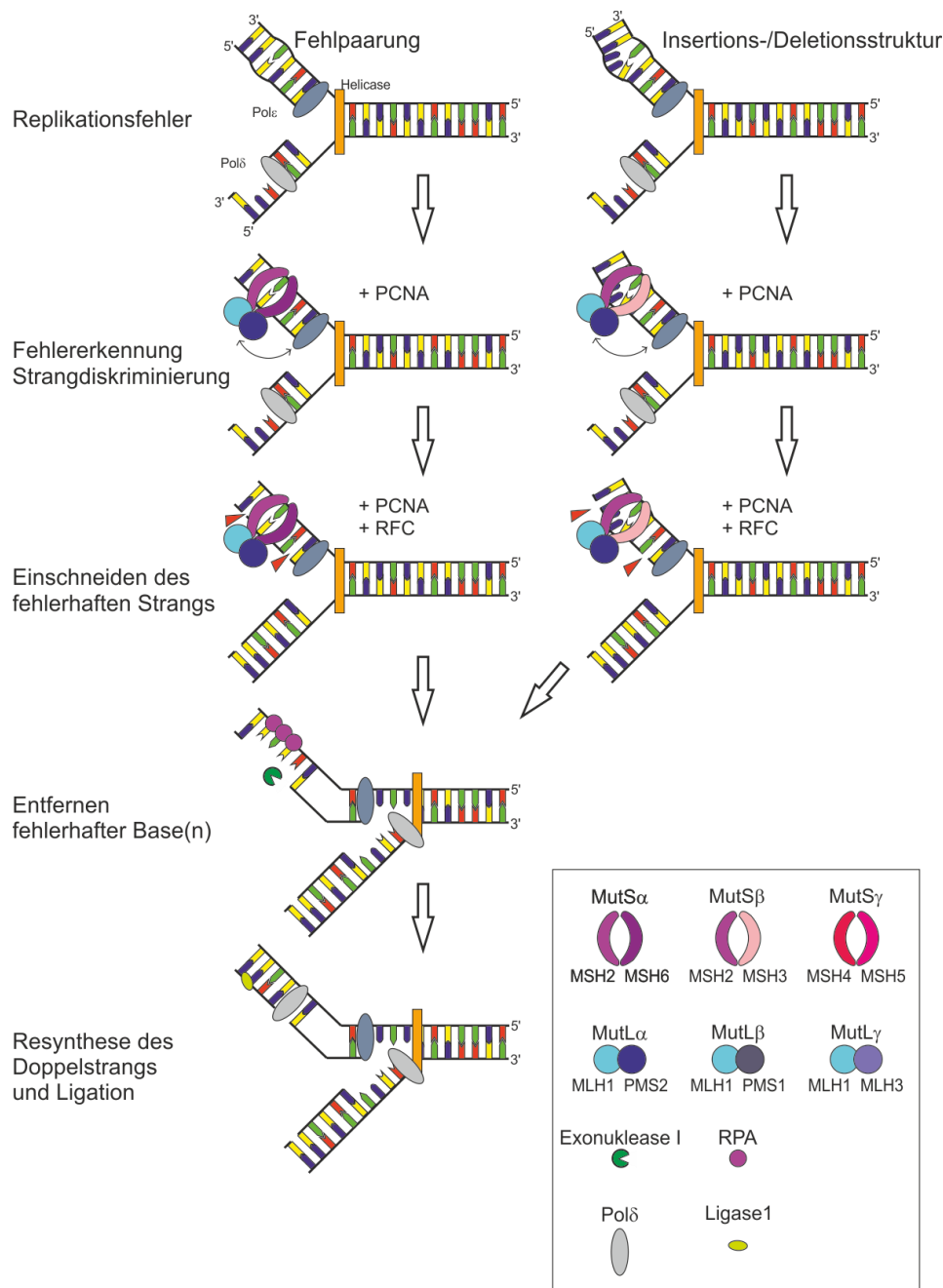


Abb.1.3 Mechanismus der MMR. Replikationsfehler der Polymerase werden durch die Heterodimere MutS α und MutS β detektiert. Nach der Strangdiskriminierung erfolgt die Inzision des neu synthetisierten Strangs durch die intrinsische Endonukleaseaktivität von MutL α in Verbindung mit den Proteinen PCNA und RFC. Die Exzision des fehlerhaften Sequenzabschnitts erfolgt durch Exonuklease I. Nach der Resynthese des Doppelstrangs werden Lücken im Einzelstrang durch Ligase1 geschlossen. Eine MutL α -unabhängige Reparatur ist für den Folgestrang denkbar, s. dazu 1.3.1.

Reparatur der Fehlpaarung

Die endonucleolytische Inzision der DNA durch MutL α ermöglicht in Folge der Strangdiskriminierung die Exzision des fehlerhaften Bereichs durch ExonukleaseI (s. Abb.3). *In vitro*-Experimente mit zirkulärer Heteroduplex-DNA haben wesentlich zur Aufklärung dieses Systems beigetragen. Es konnte gezeigt werden, dass Exonuklease I die fehlerhaften Basen ausschließlich in 5'→3' Richtung entfernt. Im Falle eines bestehenden *nicks* in 5' der Fehlpaarung konnte daher auch eine MutL α -unabhängige Reparatur artifiziell durchgeführt werden. Die Reparatur von Fehlpaarungen, die einen *nick* in 3'-Richtung aufweisen, beruht aber stets auf dem Einschneiden des fehlerhaften Strangs durch MutL α . Dies ist beispielsweise postreplikativ auf dem Leitstrang der Fall (s. Abb.3). Da ExonukleaseI-Mutationen in Maus und Hefe nur zu relativ leicht erhöhter Krebsanfälligkeit führen (Amin et al. 2001; Wei et al. 2003), ist es wahrscheinlich, dass alternativ auch weitere Exonukleasen in den Prozess eingreifen können.

Darauffolgend bindet RPA an die einzelsträngige DNA. Funktionen in der Termination der Exzision werden ebenso diskutiert wie eine Förderung der Resynthese durch Pol δ (Dzantiev et al. 2004; Zhang et al. 2005; Guo et al. 2006). LigaseI beendet durch Schließen der *nicks* den Reparaturprozess. Weiterhin konnte eine Mitwirkung von HMGB1 in MMR nachgewiesen werden, welches eine Affinität zu Unregelmäßigkeiten in der DNA aufweist und wahrscheinlich zusammen mit RPA an der Exzision der fehlerhaften Basen beteiligt ist (Yuan et al 2004; Lange und Vasquez et al. 2009).

Eine direkte Beteiligung der Heterodimere MutL β , MutL γ und MutS γ an humaner MMR konnte dagegen bisher nicht nachgewiesen werden. Beobachtungen an Knockout-Mäusen haben jedoch gezeigt, dass die Abwesenheit von Mlh3 zu einer verkürzten Lebensspanne und einem erhöhten Krebsrisiko führt. Dass Mlh3^{-/-}Pms2^{-/-}-Mäuse äquivalent verkürzte Lebensspannen zu Mlh1^{-/-}-Mäusen zeigen, spricht für eine funktionelle Redundanz dieser MLH1-Bindepartner in Mammalia (Chen et al. 2005).

1.3.2 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Wie Aaltonen et al. 1993 entdeckten, traten Replikationsfehler in Folge von MMR-Defizienz besonders häufig in kurzen, repetitiven Sequenzen auf. Sogenannte Mikrosatelliten bezeichnen Abschnitte der DNA, in denen sich eine kurze Sequenz von bis zu 4 Basenpaaren tandemartig wiederholt. Die Anzahl der Wiederholungen polymorpher Mikrosatelliten unterscheidet sich von Individuum zu Individuum und kann daher z.B. in der Forensik zur Erstellung des „genetischen Fingerabdrucks“ genutzt werden. Fehler wie Insertionen und

Deletionen treten in diesen Bereichen aufgrund eines Vor- und Zurückspringens der replikativen Polymerasen (*slippage*) auf der Sequenz gehäuft auf. Im Falle eines defekten MMR-Systems erfolgt daraufhin keine Reparatur, was zu unterschiedlichen Mikrosatellitenlängen der Tochterzellen nach der Zellteilung führt. Lawrence A. Loeb postulierte bereits 1974, dass eine genetische Destabilisierung zu einer Anfälligkeit für maligne Veränderungen von Zellen führt (Loeb et al. 1974). Die Entwicklung internationaler Kriterien zur eindeutigen klinischen Diagnose von MSI durch Boland et al. führte 1998 zu einer Festlegung von 5 zu testenden Mikrosatellitensequenzen des nicht codierenden Bereichs des Genoms, der sogenannten Bethesda-Richtlinien.

1.3.3 Instabilität codierender Mikrosatelliten

MSI tritt ebenso in Gen-codierenden Bereichen der DNA auf. Gene, die codierende Mikrosatelliten (*coding microsatellites*, cMS) tragen, sind in Tumoren mit MMR-Defizienz besonders häufig von Mutagenese betroffen. MSI führt zu Replikationsfehlern in diesen Bereichen, die im schlimmsten Fall in Leserahmenverschiebungen resultieren können. Die Verschiebung des Tripletcodes verändert die Aminosäuresequenz des translatierten Genprodukts und führt in den meisten Fällen zu einer vorzeitigen Termination der Translation.

Als kritisches Gen ist z.B. das Tumorsuppressorgen APC (*adenomatous polyposis coli*) bekannt (Reitmair et al. 1996; Otsuka et al. 2003). Durch Bindung an Transkriptionsfaktoren hemmt das Protein APC durch Retention die Expression von Onkogenen wie cMyc im Wnt-Signalweg. Besonders häufig treten Mutationen des Gens in der sogenannten MCR-Region (*mutation cluster region*) auf (Huang et al. 2003), die mehrere Einfach-Nukleotid-Wiederholungen aufweist. Eine Mutation von APC kann zum Verlust der Funktion und zu malignen Tumoren führen. Seit 1995 ist eine Vielzahl in Folge von MSI mutierter cMS nachgewiesen worden (Duval und Hamelin 2002). Für die Überzahl der betroffenen Genprodukte kann eine wachstumsregulierende oder pro-apoptotische Funktion nachgewiesen werden, wodurch ein Ausfall häufig im Zusammenhang mit Proliferation und Tumorigenese steht. In Zellen mit MSS-Status (Mikrosatellitenstabilität) werden dagegen keine oder sehr selten Leserahmenverschiebungen gefunden (s. Woerner et al. 2001).

Es kann daher auch von einer sich schrittweise entfaltenden MSI gesprochen werden, da eine MMR-Defizienz in einem sich selbst verstärkenden Prozess mündet. Dies legt die Vermutung nahe, dass derartig instabile Zellen über die Entstehung einer Mutageneseplattform soweit verändert werden, dass eine Auslösung von Apoptose die Folge ist. Auf diese Weise könnte

die Anhäufung von Zellen mit mutagenem Potential innerhalb eines Organismus unterdrückt werden. In Einzelfällen führt jedoch die Inaktivierung bestimmter cMS-tragender Gene zu einem Wachstumsvorteil und zu einem selektiven Auswachsen betroffener Zellen (Kim et al. 2002). Die Instabilität codierender Mikrosatelliten repräsentiert daher den Schlüsselmechanismus der Tumorigenese in MMR-defizienten Tumoren (Mori et al. 2001; Kloor et al. 2010). Der von Loeb bereits 1974 postulierte Mutatorphänotyp ist daher auf die Mutageneseplattform der cMS zurückzuführen.

1.3.4 MMR-Beteiligung an der Auslösung von Apoptose nach DNA Schäden

Bei vielen Therapien von Krebserkrankungen kommen geno- und cytotoxische Agenzien zum Einsatz, die Zelltod auslösen. Diese Wirkung beruht oft auf der Induktion schwerer oder irreparabler DNA-Schäden, die von zelleigenen Mechanismen erkannt werden und daraufhin Apoptose über Signalkaskaden auslösen können. Tumorzellen, die eine Resistenz gegenüber derartigen Chemotherapeutika entwickeln, weisen häufig ein defektes MMR-System auf. Unter anderem sind Mutationen in einzelnen MMR-Genen für Resistenzen gegenüber Temozolomid (TMZ), N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) und 6-Thioguanin (6-TG) verantwortlich. Der Einsatz dieser Agenzien hat verschiedene Methylierungen von DNA-Basen zur Folge, die durch verschiedene Reparaturmechanismen erkannt werden. Während einige Schäden direkt repariert werden können, beruht die Toxizität auf O⁶-Methylguanin (bzw. Methylthioguanin) (Stojic et al 2004). Erfährt dieser Schaden keine direkte Reparatur durch MGMT (Sedgwick und Lindahl 2002, s. 1.2.1) bewirkt die Methylierung eine Strukturveränderung des Guanins, die eine Ähnlichkeit mit der Base Adenin hervorruft (Loechler et al. 1987). In der darauf folgenden Replikation der DNA resultiert diese Strukturveränderung im Einbau der Base T gegenüber des methylierten Guanins (O⁶^{meG}/T). Diese Fehlpaarung wird durch MutSα erkannt und gebunden (Duckett et al 1996). Für den weiterführenden Prozess der Auslösung der Signalkaskade existieren zwei Modelle, die jeweils experimentell nachgewiesen werden konnten (Abb.1.4). Da für beide Modelle überzeugende Argumente vorliegen, kann kein Modell ausgeschlossen werden (Fishel 1998; Karran et al. 2001; Yoshioka et al. 2006; York und Modrich 2006; Cejka und Jiricny 2008; Quiros et al. 2010).

MMR ist daher durch die Eliminierung von stark beschädigten Zellen an kurzfristiger, sowie über die Vermeidung von Replikationsfehlern an langfristiger Unterdrückung von Mutationen maßgeblich beteiligt. Dies spiegelt die facettenreichen Funktionen des MMR-Systems in der Antwort auf DNA-Schäden wider.

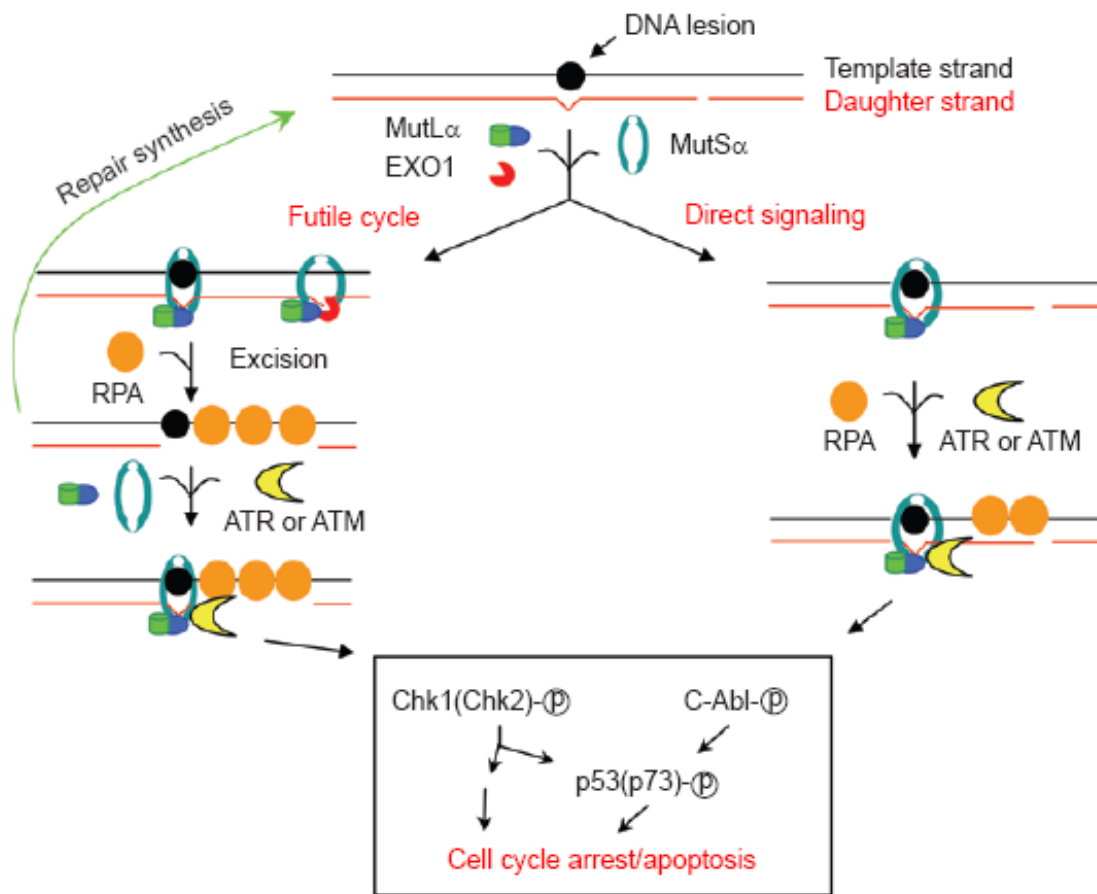


Abb.1.4 MMR-Beteiligung an der Auslösung von Apoptose nach DNA Schäden. DNA-Läsionen wie O₆^{me}G führen in der darauffolgenden Replikation zur Insertion einer falschen Base an der gegenüberliegenden Position des DNA-Doppelstrangs. Im „futile cycling“-Modell (links) wird diese Fehlpaarung durch das MMR-System in wiederholten Zyklen detektiert und prozessiert, wobei stets erneut eine Fehlpaarung erfolgt. Die durch wiederholte Reparatur entstehenden einzelsträngigen DNA-Bereiche und *nicks* resultieren in der zweiten Replikation nach der Schädigung in DNA-Doppelstrangbrüchen, die eine ATM/ATR- sowie Chk1/Chk2-vermittelte Zellzyklus-Arretierung vermitteln. Das „direct signaling“-Modell (rechts) argumentiert für eine direkte Interaktion mit den Zellzykluskontrollproteinen und aktiviert auf diese Weise eine apoptotische Signalkaskade. Aus: Li et al. 2008.

1.3.5 Beteiligung von MMR-Proteinen an der Meiose

Im Gegensatz zur ungeklärten Beteiligung in MMR sind für die Proteine der Komplexe MutL γ und MutS γ zahlreiche Funktionen während der Meiose bekannt. Für MSH4 und MSH5 konnte schon 1997 in Hefe eine Rolle in der Meiose nachgewiesen werden. Neben der Erkenntnis, dass MSH4/MSH5 ein Heterodimer bildet, wurde auch gezeigt, dass die Funktion nicht wie erwartet auf der Reparatur von Heteroduplex-DNA beruht. In Modellsystemen wie *C.elegans* und *S.cerevisiae* konnte eine eindeutige Abhängigkeit der Entstehung von crossing-over von MSH4/MSH5 gezeigt werden. Diese Erkenntnisse führten zu der Vermutung, dass

MutS γ nicht in Auflösung oder Reparatur, sondern in der Entstehung von crossing-over-Ereignissen beteiligt ist. Snowden et al. zeigten 2004 *in vitro* die Bindung von humanem MutS γ an Holliday-Strukturen und ein Entlanggleiten auf der DNA, vergleichbar mit MutS α/β . Es wird angenommen, dass auf diese Weise das Holliday-Struktur-Intermediat während der Meiose bis zur Auflösung stabilisiert und eine akkurate Chromosomensegregation gewährleistet wird.

Äquivalent zu den MutS α/β -MutL α -Heterotetrameren der postreplikativen Reparatur wird davon ausgegangen, dass die Funktionen in der Meiose über eine MutS γ -MutL γ -Struktur erfolgen. Dabei erfolgt die Bindung höchstwahrscheinlich über MSH4 und MLH3. MLH1 und MLH3 wurden diesbezüglich co-lokalisiert an den Chiasmata, den physikalischen Orten von crossing-over, in murinen und humanen Zellen detektiert, wobei die Bindung von MLH1 nur in Anwesenheit von MLH3 erfolgt (Kolas et al. 2005; Oliver-Bonet et al. 2005). Kolas und Cohen 2004 schreiben Mlh1 in muriner Meiose eine stabilisierende Rolle zu, während die Bildung von *recombination nodules*, und damit von crossing-overs, Mlh3-abhängig ist. Die entscheidende Rolle der MMR-Proteine in der Aufrechterhaltung akkurater Zellteilung ist auch an Knockout-Mäusen erkennbar. Knockout von Mlh3, Msh4 oder Msh5 führt zu meiotischem Arrest und Apoptose von meiotischen Zellen und resultiert in Sterilität.

Ein aktuelles Modell beschreibt den Prozess der Auswahl von crossing-over-Orten als Stufenmodell. Mit Beginn der Prophase I (Leptotän) akkumuliert MutS γ an einer Teilmenge von Doppelstrangreparaturstellen. Nach einer Vorselektion erfolgt durch die Bindung von MutL γ an MutS γ die Festlegung von Sequenzabschnitten, an denen crossing-over stattfinden kann (Kolas und Cohen 2004).

1.3.6 Homologien von MutL-Proteinkomplexen

Die Schlüsselfunktion von MutL α , die Inzision des fehlerhaften Strangs, wurde 2006 von Kadyrov et al. in Form einer intrinsischen Endonuklease der Untereinheit PMS2 beschrieben. Das Aminosäuremotiv DQHA(X)₂E(X)₄E wurde dabei als essentielle Komponente der Enzymaktivität ausgemacht. Kosinski et al. zeigten 2008, dass die Endonuklease durch mindestens zwei weitere Motive gekennzeichnet ist, die hoch konserviert auch in Bakterien und Archea auftreten. Unter den humanen MutL-Homologen weisen neben PMS2 auch PMS1 und MLH3 Teile der Kernmotive der Endonuklease-Domäne auf. Während die Proteinsequenz von PMS1 lediglich ein einziges konserviertes Motiv und nicht das durch

Kadyrov identifizierte, zentrale Motiv trägt, können in MLH3 alle bekannten Domänen gezeigt werden (Abb.1.5).

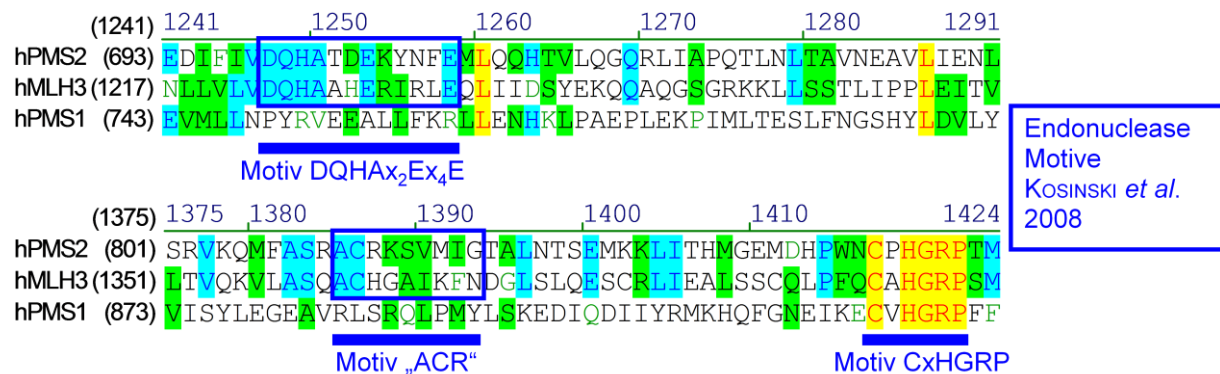


Abb.1.5 Sequenzabgleich der humanen MutL-homologen MMR-Proteine. Blaue Balken und Rechtecke kennzeichnen Motive der für PMS2 beschriebenen intrinsischen Endonuklease. Während in PMS1 lediglich das Motiv CXHGRP gefunden werden kann, treten in PMS2 und MLH3 weiterhin die Motive DQHA(X)₂E(X)₄E und ACR auf.

Aufgrund der fehlenden Endonuklease-Sequenzmotive in PMS1 erscheint eine aktive Beteiligung von MutL β an MMR unwahrscheinlich. Die Sequenzanalyse von MLH3 unterstützt dagegen die Idee einer funktionellen Redundanz zwischen MutL γ und MutL α . Diese mögliche Redundanz konnte jedoch bisher in menschlichen Zellen nicht nachgewiesen werden. Funktionen von MLH3 in MMR konnten bisher lediglich in Hefe- und Mauszellen bei der Korrektur von IDLs (Flores-Rozas und Kolodner 1998; Chen et al. 2008) sowie anhand *in vitro* translatierter Proteine gezeigt werden (Cannavo et al. 2005). Diese Wissenslücke ist in erster Linie auf die Ermangelung eines geeigneten Modellsystems zurückzuführen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen mögliche Funktionen von MutL γ und MutS γ in der MMR untersucht werden. Im Falle einer Redundanz der α/β - und γ -Heterodimere wäre davon auszugehen, dass in Folge eines Funktionsverlusts der postreplikativen Mechanismen eine Kompensation durch MutL γ und MutS γ stattfindet. Dazu sollen humane Tumorzelllinien mit bekannten Defekten des postreplikativen MMR-Systems hinsichtlich der Expression von MSH4, MSH5 und MLH3 untersucht werden.

Weiterhin soll eine Beteiligung von MutS γ und MutL γ an MMR durch biologische Assays untersucht werden. Hierfür soll ein Untersuchungssystem etabliert werden, das eine Überprüfung von Reparaturfunktionen in stabil exprimierenden humanen Zellen ermöglicht. Insbesondere soll in MMR-defizienten Zelllinien untersucht werden, inwiefern durch rekombinante Expression von MSH4, MSH5 und MLH3 eine Rekonstitution der Reparaturfunktion erreicht werden kann. Eine Reparatur durch MutS γ und MutL γ in Folge von induzierten DNA-Schäden nach UV-Bestrahlung soll mittels *live cell imaging* überprüft werden. Der Einsatz alkylierender Chemotherapeutika soll letztendlich, über die Untersuchung der Endonuklease-Aktivität von MLH3, Aufschluss über mögliche Redundanz der α/β - und γ -Heterodimere liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

In diesem Kapitel sind die zur Durchführung der Versuche verwendeten Materialien und Geräte sowie deren Hersteller tabellarisch aufgeführt. Das verwendete Wasser (im Folgenden: Wasser (bidest.)) wurde mit einer Deionisierungsanlage (Milli-Q, Millipore, USA) aufbereitet. Wenn angegeben, wurden Lösungen für 20 min bei 121 °C und 100 kPa autoklaviert (LTA 32/35, Zirbus).

2.1.1 Chemikalien

Tab.2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien unter Angabe der jeweiligen Hersteller bzw. Anbieter.

Chemikalien	Hersteller
6x Ladepuffer	Fermentas
10x Ligation Buffer	Fermentas
10x PCR Puffer	Takara
10x PCR-Puffer	5Prime
β-Mercaptoethanol	Fluka
5x First-Strand Buffer	Invitrogen
Aceton	J.T.Baker
Acrylamid (30 %; 37,5:1)	Bio-Rad
Agar Bacteriological (Agar No.1)	Oxoid
Agarose	Invitrogen
Ampicillin Sodium Salt	MP Biomedicals, Inc.
Ammoniumacetat	Roth
Ammonium Persulfate	Serva
BactoTryptone	BD
Bacto Yeast Extract	BD
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform	J.T.Baker
Complete Protease Inhibitor	Roche
DMEM	Gibco
Dimethyl sulfoxide	Riedel-de-Haën
DTT	Invitrogen
DV KC	Roth
Essigsäure (100 %)	Roth
Ethanol	J.T.Baker
Ethidium-Bromid	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure	Fluka
Fötales Rinderserumalbumin	Sigma
Glucose	Merck
Glycerin (99 % GC)	Sigma
Glycin	Roth
HamF12	Gibco
HCl	Roth
Imidazol	IBA

Immersol	Zeiss
IPTG	Promega
Isopropanol	J.T.Baker
K ₂ HPO ₄	Merck
KaryoMAX Colcemid	Gibco
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad
KCl	Fluka
KH ₂ PO ₄	Merck
L-Glutamin	Gibco
LiCl	Merck
McCoy's 5A	Gibco
MEM	Gibco
MEM Non-Essential Amino Acids	Gibco
MEM Sodium Pyruvate	Gibco
Methanol	J.T.Baker
N-Butanol	Sigma
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Merck
NaCl	Roth
NaOH	Roth
Na ₃ VO ₄	Roth
Nuclear Complex Co-IP Kit	Active Motif
O ⁶ -Benzylguanin	Sigma
Penicillin/ Streptomycin	Gibco
Pepstatin	Serva
PMSF	Serva
Poly-L-Lysin	Sigma
Puromycin	Sigma
RNAse	Sigma
RPMI 1640	Gibco
Sodium-Dodecylsulfate	Serva
Skim Milk Powder	Oxoid
Streptavidin (gekoppelt mit <i>horseradish peroxidase</i>)	GE Healthcare
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Fermentas
TaKaRa Taq™ Hot Start Version	Takara
TEMED	Serva
Temozolomid	Sigma
Thioharnstoff	Fluka
Trizma base (Tris)	Sigma
Trizol	Invitrogen
Trypane Blue Solution	Sigma
Trypsin/ EDTA (0,05 %)	Gibco
Tween 20	Sigma
Western Lightning Chemiluminescence Reagent	PerkinElmer LAS, Inc.
X-Ray developer LX24	Kodak
X-Ray fixer AL4	Kodak

2.1.2 Kits

Tab.2.2 Übersicht über die verwendeten Kits.

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits unter Angabe der jeweiligen Hersteller bzw. Anbieter.

Kit	Hersteller
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
NucleoSpin Plasmid QuickPure	Macherey und Nagel

2.1.3 Enzyme

Tab.2.3 Übersicht über die verwendeten Enzyme.

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme unter Angabe der jeweiligen Hersteller bzw. Anbieter.

Enzyme	Hersteller
PCR Extender Taq	5Prime
Superscript III RT	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Fermentas
Taq Hot Start Version	TaKaRa
verschiedene Restriktionsenzyme	Fermentas New England Biolabs

2.1.4 Antikörper

Tab.2.4 Übersicht über die verwendeten Antikörper. Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper unter Angabe der jeweiligen Herstellerbezeichnung, Spezies, Antikörperart, eingesetzter Verdünnung und Verwendung. WB:Western Blot; Co-IP:Co-Immunpräzipitation; IF:Immunfärbung.

Spezifität/Antikörper	Hersteller/Bezeichnung	Spezies	Antikörperart	eingesetzte Verdünnung	Verwendung
γH2AX	millipore 05-636	Maus	monoklonal	1:1000	IF
γTubulin	Sigma	Maus	monoklonal	1:50	IF
GFP	USBiological G8965-12	Kaninchen	polyklonal	WB: 1:5000; Co-IP: 1:200-1:500	WB, Co-IP
MLH1 (Ab-1)	oncogene NA28	Maus	monoklonal	1:500	WB, Co-IP
MLH3	Acris APO1288PU-N	Kaninchen	polyklonal		WB
MLH3 (A301-849A)	Bethyl A301-849A	Kaninchen	polyklonal		WB
MLH3 (H-2)	Santa Cruz sc-25313	Maus	monoklonal		WB
MSH2 (27)	BD Biosciences M34520-050	Maus	monoklonal	1:500	WB, Co-IP
MSH3 (52)	BD Biosciences M94120-050	Maus	monoklonal	1:250	WB, Co-IP
MSH4	abcam ab13786	Ziege	polyklonal		WB
MSH5	abcam ab13819	Ziege	polyklonal		WB
MSH6 (GTBP)	BD Biosciences G70220-050	Maus	monoklonal	1:500	WB, Co-IP
PCNA	abcam ab19167	Kaninchen	polyklonal	1:20000	WB
PMS1	Santa cruz sc-615	Kaninchen	polyklonal	1:1000	WB, Co-IP
PMS2	abcam ab2178	Kaninchen	polyklonal	1:2000	WB, Co-IP
TagRFP	Evrogen AB233	Kaninchen	polyklonal	1:10.000	WB, Co-IP
Kaninchen, HRP-gekoppelt	GE Healthcare NA934V	Esel	polyklonal	1:2500	WB, Co-IP
Maus HRP-gekoppelt	GE Healthcare NA931V	Schaf	polyklonal	1:2500	WB, Co-IP
Ziege, biotinyliert	GE Healthcare RPN1025V	Esel	polyklonal	1:2500	WB
Maus TRITC-gekoppelt	Southern biotechnology	Ziege		1:200	IF

2.1.5 Verbrauchs- und Glasmaterialien

Tab. 2.5 Übersicht über die Verbrauchs- und Glasmaterialien.

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchs- und Glasmaterialien unter Angabe der jeweiligen Hersteller bzw. Anbieter.

Verbrauchs- und Glasmaterial	Hersteller
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH
Erlenmeyerkolben mit Schikane	Schott
Filterpapier	Whatman
Gewebekulturschalen, Nunclon™ Delta Surface	Nunc
Glasflaschen und weitere Behälter	Schott
Glaspipetten	Brand
Kammerdeckgläser	LabTek
Kammerobjektträger	LabTek
Kryoröhrchen	Nunc
Kunststoffreaktionsgefäße (14 und 50 ml)	Falcon
Kulturflaschen (25, 80 und 175 cm ²)	Nunc
Multiwellplatten (6, 12, 24 und 96 Wells)	Nunc
Pasteurpipetten	Brand
Petrischalen	Greiner
PVDF-Membran	Bio-Rad
Quarzküvetten	Omnilab
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym
Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf
Röntgenfilm, 100 NIF, 18x24 Super RX	Fuji
Spitzen für Kombipipetten	Eppendorf
Spitzen für Mikropipetten	Greiner, Rainin

2.1.6 Geräte

Tab.2.6 Übersicht über die Geräte.

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte unter Angabe der jeweiligen Hersteller bzw. Anbieter.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Horizon 58	Gibco BRL
	Horizon 11·14	Gibco BRL
Analysenwaagen	P200D	Sartorius
	P200S	Sartorius
	Laboratory	Sartorius
Autoklav	LTA 32/35	Zirbus
CO ₂ -Inkubator	C	Binder
Eismaschine	AF-100	Scotsman
Elektroblot-Apparatur	Semi-Dry Transfer Cell	Trans-Blot SD
Elektroporations-Apparatur	EasyjecT Prima (2500 V)	Equibio
Gasbrenner	Fireboy Eco	Tecnomara
Geldokumentationssystem	EDAS 290	Kodak
Heizblöcke	Thermostat 5320	Eppendorf
Heizplatte mit Rührer	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik
Kryoboxen		Nalgene
Kühlschränke (4 °C)		Liebherr

Mehrkanalpipetten		Titertek
Mikropipetten (0,1 – 1000 µl)		Eppendorf, Rainin
Mikroskope	Axioskop, Zeiss	Zeiss
	ID03, Zeiss	Zeiss
	Axiovert 100	Zeiss
	LSM 510 Meta	Zeiss
Mikroskopzubehör für Axiovert 100 :		
Filtersätze		Chroma
10x/0,25	PlanNeoFluar	Zeiss
20x/0,5	PlanNeoFluar	Zeiss
40x/0,75	PlanNeoFluar	Zeiss
Digitale Kamera	Coolsnap ES2	Visitron Systems
Mikroskopzubehör für LSM 510 Meta:		
40x/1,3 oil	PlanNeoFluar	Zeiss
Inkubationskammer		ibidi
Gasmischer	The Brick	ibidi
Ampere-Messgerät	P-9710-2	Gigahertz Optik
UV Ar Ion Laser (364nm)	enterprise II, 80mW	coherent
Ar Laser (488nm)	Argon/2 30mW	
He/Ne Laser (543nm)	HeNe1	
Objektivheizung		Zeiss
Multipipetten		Eppendorf
PAGE-Apparatur		Bio-Rad
pH-Meter	Calimatic 766	Knick
Photometer	Nanodrop 1000	Nanodrop
	Genesys 10 UV	Thermo Spectronic
Pipettierhilfen	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Schüttler	Certomat H	B. Braun Biotech International
		New Brunswick Scientific
	GFL 3015	Omnilab
	Certomat IS	Sartorius
SpeedVac	UNIVAPO 150 H	Zirbus
Sterilbänke	LaminAir HLB 2472 GS	Heraeus
	SterilGARD Hood Class II Type A/B3	The Baker Company, Inc.
Thermocycler	I-Cycler	Bio-Rad
Tiefkühlschränke (-20 °C)		Liebherr
Tiefkühlschränke (-80 °C)	Bio-Freezer	Forma Scientific
Tischschweißgerät	423	Polystar
Trockenschrank	Thermocenter	Zapf Instruments
Über-Kopf-Schüttler	GFL 3025	Omnilab
UV-Tisch	UV Transilluminator	UVP, Inc.
Ultraschallgerät	Sonoplus 200	Bandelin
Vortexer	Vibrofix VF1 Electronic	IKA
Wasserdeionisierungsanlage	Milli-Q	Millipore
Wasserbäder	Fisons D8-L	Haake
		Köttermann
Zählkammer	improved	Neubauer
Zentrifugen	Allegra X-15R	BeckmanCoulter
	5424	Eppendorf

Zentrifugen (fortgesetzt)	5415 C	Eppendorf
	2K15C	Sigma
	5804	Eppendorf
	Sepatech Biofuge A	Heraeus
	3K30	Sigma
	RC5C	Sorvall Instruments

2.1.7 Nukleinsäuren

Tab.2.7 Übersicht über Größenstandards, Nukleotide und Plasmide.

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards, Nukleotide und Plasmide unter Angabe der jeweiligen Hersteller bzw. Anbieter.

Nukleinsäuren	Hersteller
1 kb DNA Ladder	Invitrogen
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas
dNTP Mixture	Takara
Random Primers	Invitrogen
pGEM®-T-Easy Vector System I	Promega
pMC-EGFP-N	
pMC-CFPP-N	
pMC-YFPP-N	
pMC2-TagRFP-PCNA-H	

Tab. 2.8 Übersicht über verwendete Primer.

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer und Oligonukleotide unter Angabe der angewandten Annealing-Temperatur und der erwarteten Fragmentgröße nach Amplifikation von cDNA.

	Nukleinsäuresequenz (5'→3')	Annealing-	Fragment-
ABL Forw	TGACTTTGAGCCTCAGGTCTGAGTGAAG	60	216
ABL Rev	CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATTC	60	
MLH1 MluI Forw	ACGCGT ATGTCGTTTCG TGGCAGGGG TTATTC	60	1175
MLH1 AvaI Forw	CAGATGGTTCGTACAGATTCCCGGGA	60	
MLH1 AvaI Rev	TCCCGGGAATCTGTACGAACCATCTG	60	1134
MLH1 ApaI Rev	GGGCCC TTAACACCTCTCAAAGACTT TGTATAGATCAG	60	
PMS2 MluI Forw	ACGCGT ATGGAGCGAGCTGAGAGCTC	58	743
PMS2 PvuII Rev	GGCAGCTGAACAAAAGGAATGAGGC	58	
PMS2 PvuII Forw	GCCTCATTCCTTTTGTTCAGCTGCC	60	1204
PMS2 BspHI Rev	CTTTGCTGTGCTTCATGATGTAAGTGC	60	
PMS2 BspHI For.	GCAGTTACATCATGAAGCACAGCAAAG	60	706
PMS2 ApaI Rev	GGGCCC TCAGTTCTGAGAAATGACACCCAGGTTG	60	
PMS1 MluI Forw	ACGCGT ATGAAACAATTGCCTGCGGCAACAG	60	816
PMS1 SalI Rev	TTTTTGATGTACTGGTCGACTGTTATGAAGAT	60	
PMS1 SalI Forw	ATCTTCATAAACAGTCGACCAGTACATCAAAAA	60	1210
PMS1 CfoI Rev	CCAAATTCCATGCGCTGGTGGGTTT	60	
PMS1 CfoI Forw	AAACCCACCAGCGCATGGAATTTGG	60	844
PMS1 ApaI Rev	GGGCCCTCATGTAGTTTCTGGAAGATAGGTTAAATGATGAA	60	
MLH3 MluI Forw	ACGCGTATGATCAAGTGCTGTGTCAGTTGAAGTACAA	60	441
MLH3 CfoI Rev	AGTAGTCCCAGCGCTTGCTCT	60	
MLH3 CfoI Forw	AGAGCAAGCGCTGGGACTACT	60	1170

MLH3 XbaI Rev	CCATATTCTAGATCCTGCCACTCTCC	60	
MLH3 XbaI Forw	GGAGAGTGGGCAGGATCTAGAAATATGG	60	357
MLH3 AspI Rev	GCACGTGTGGGACCAGGTCTAACATAAT	60	
MLH3 AspI Forw	ATTATGTTAGACCTGGTCCACACGTGC	60	1462
MLH3 XhoI Rev	GCTCGAGCTCTCGGAAGGAAAG	60	
MLH3 XhoI For	CTTTCCTTCCGAGAGCTCGAGC	60	1043
MLH3 ApaI Rev	GGGCCC TCATGGTGGCTCACAGGGAGGC	60	
MLH3 5'UTR Forw	CGCACGAGCCTCAAGATCCAAG	60	
MLH3 mutATP Forw	GGCCAT AAG CTC CTTGGG CCA ATG TGT TGA GGC ACT TG	65	378
MLH3 mutATP Rev	CCAGCGCTT GCT CTA GTC ACA TCA GCT TCGCATGCT T	65	
MLH3 del.N Forw	ACGCGT ATG AAG GTT AGG CAG AGA ATA GAA GCT CTC	60	
MLH3 del.C Rev	GGGCCC TCAAGA AGG TCT CCC GTG AGC ACA CTG	60	
MSH5 MluI Forw	ACGCGT ATGGCCTCCTTAGGAGCGAAGCC	60	911
MSH5 SacI Rev	CTGAGCTCCCCCAGGTCATGAGT	60	
MSH5 SacI Forw	ACTCATGACCTGGGGGAGCTCAG	60	792
MSH5 SmaI Rev	GTCCCGGCAGCACTGGCAA	60	
MSH5 SmaI Forw	TTGCCAGTGCTGCCCCGGGAC	60	908
MSH5 ApaI Rev	GGGCCC TCAGAGGATGCTGGTGGCAGCA	60	
MSH4 MluI Forw	ACGCGT ATGCTGAGGCCTGAGATCTCATCA	60	840
MSH4 PvuII Rev	AAGCTGCAACAGCTGCAAGGC	60	
MSH4 PvuII Forw	GCCTTGCAGCTGTTGCAGCTT	60	790
MSH4 XhoI Rev	GATGAAAAATCCTCGAGCAGAGCTAAAA	60	
MSH4 XhoI Forw	TTTATGCTCTGCTCGAGGATTTTTCATC	60	1222
MSH4 ApaI Rev	GGGCCCTTATTCTTCAGTCTTTCTGGAACCTGTTCAGT	60	
His Forw	AGCTG CC ATG GCTAGC AGAGGAAGT CATCACCATCACCATCAC GGCGCC C A		
His Rev	AGCTT G GGCGCC GTGATGGTATGGTATG ACTTCCTCT GCTAGC CAT GG C		

2.1.8 Humane Zelllinien

In dieser Arbeit wurden immortalisierte Sekundärkulturen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, eingesetzt. Weiterhin wurde die Primärkultur MRC-5 verwendet (zur Verfügung gestellt von W. Dirks). Alle verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tab.2.9 Übersicht über humane Zelllinien.

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien ggf. unter Angabe der der DSMZ ACC Nummer und des Tumors, aus dem die Linie etabliert wurde. Darüber hinaus sind die zur Kultivierung verwendeten Medien (vgl. Tab. 2.10) sowie der Status in Bezug auf Mikrosatellitenstabilität gemäß BAT26-Analyse angegeben.

ACC	Zelllinie	Beschreibung	Medium	Status
6	PEER	T-Zell-Leukämie	4	MSS
7	CML-T1	T-Zell-Leukämie	2	MSI
34	P121CHIKAWA	T-Zell-Leukämie	2	MSS
36	MOLT-17	T-Zell-Leukämie	2	MSI
38	PF-382	T-Zell-Leukämie	2	MSS

40	CTV-1	Akute myeloische Leukämie	4	MSI
42	697	Precursor B-Zell Leukämie	2,3,4	MSS
83	DG-75	Burkitt-Lymphom	5	MSI
105	KARPAS-45	T-Zell-Leukämie	4	MSI
128	NALM-6	Precursor B-Zell Leukämie	2	MSI
131	NALM-1	Chronische myeloide Leukemie in der Blastenkrise	4	MSI
140	SUP-T1	T-Zell-Lymphom	2	MSI
163	NCI-H929	Multiples Myelom	6	MSI
189	LN-405	Astrozytom	1	MSI
198	COLO-704	Eierstock Adenokarzinom	2	MSI
201	23132/87	Magenadenokarzinom	2	MSI
240	CCRF-CEM	T-Zell-Leukämie	2	MSI
256	LNCAP	Prostatakarzinom	4	MSI
261	DU-145	Prostatakarzinom	2	MSI
278	DLD-1	Kolonadenokarzinom	2	MSI
282	JURKAT	T-Zell-Leukämie	5	MSI
305	293	Embryonale Niere	1	MSS
307	DV-90	Lungenadenokarzinom	7	MSI
315	HT-1080	Fibrosarkom	1	MSS
337	MHH-CALL4	Precursor B-Zell Leukämie	4	MSS
341	MHH-CALL2	Precursor B-Zell Leukämie	4	MSS
350	LOVO	Kolonadenokarzinom	2	MSI
354	MHH-PREB-1	B-Zell-Lymphom	2	MSI
389	SUP-B15	Precursor B-Zell Leukämie	11	MSS
396	BE-13	T-Zell-Leukämie	4	MSS
399	TANOUE	B-Zell-Leukämie	2	MSI
403	MT-3	Brustkarzinom	9	MSI
413	639-V	Harnleiterkarzinom	1	MSI
419	MFE-296	Gebärmutterschleimhaut Adenokarzinom	7	MSI
423	MFE-319	Gebärmutterschleimhaut Adenokarzinom	2	MSI
435	HSB-2	T-Zell-Leukämie	2	MSI
438	22RV1	Prostatakarzinom	8	MSI
439	CAL-72	Osteosarkom	2	MSI
496	HCC-15	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	2	MSI
506	H-1339	Kleinzelliges Lungenkarzinom	4	MSI
519	KCL-22	Chronische myeloische Leukämie in der Blastenkrise	1	MSI
520	CL-34	Kolonkarzinom	13	MSI
521	TALL-1	T-Zell-Leukämie	3	MSS
525	DND-41	T-Zell-Leukämie	2	MSI
531	DERL-2	T-Zell-Lymphom	10	MSS
540	H-1963	Kleinzelliges Lungenkarzinom	8	MSI
558	SC-1	B-Zell-Lymphom	2,3,4	MSS
559	MOTN-1	T-Zell-Leukämie	4	MSS
584	REC-1	B-Zell-Lymphom	2	MSS
605	SUP-T11	T-Zell-Leukämie	2	MSS
610	HAL-1	Precursor B-Zell Leukämie	2	MSS
612	WSU-FSCCL	B-Zell-Lymphom	2	MSS
627	ULA	B-Zell-Lymphom	12	MSS
633	U-2932	B-Zell-Lymphom	2	MSS
653	293T	Embryonale Niere	1	MSI
-	MRC-5	gesunde embryonale Lunge	14	MSS

Tab.2.10 Übersicht über Zellkulturmedien.

Aufgeführt ist die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien.

Nr.	Zellkulturmedium
1	DMEM + 10 % FBS
2	RPMI 1640 + 10 % FBS
3	RPMI 1640 + 15 % FBS
4	RPMI 1640 + 20 % FBS
5	RPMI 1640 + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin
6	RPMI 1640 + 20 % FBS + 2 mM L-Glutamin
7	RPMI 1640 + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin + NEAS
8	RPMI 1640/ DMEM + 20 % FBS
9	RPMI 1640/ MEM + 20 % FBS + 2 mM L-Glutamin + 1 mM Natrium-Pyruvat
10	RPMI 1640 + 20% FBS + 20 ng/ml human IL-2
11	Mc Coy's 5A + 20 % FBS
12	Iscove's MDM + Optimem (at 1:1) + 20% FBS
13	DMEM/ Ham F12 + 20 % FBS
14	MEM + 10 % FBS + Pen/Strep

2.1.9 Bakterienstämme

Die Replikation von Plasmiden erfolgte durch Transformation in *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene). Der Stamm ermöglicht blau-weiß-Screening in Kombination mit entsprechenden Plasmiden und trägt eine Tetracyclinresistenz.

XL1-Blue Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)].

2.2 Bakterienkultur**2.2.1 Kulturmedien**

Die Kultivierung von Bakterien erfolgt in LB (*luria broth*)- oder TB (*terrific broth*)-Medium.

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton
 5 g/l Hefe-Extrakt
 10 g/l NaCl
 50 mg/l Ampicillin

Ampicillin wird nach dem Autoklavieren zum Medium gegeben. Die Stammlösung liegt 1000fach konzentriert in Wasser vor.

Zur Herstellung von Agarplatten werden vor dem Autoklavieren 13 g/l Agar zu dem LB-Medium gegeben. Mit NaOH wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die Zugabe von Ampicillin erfolgt nach dem Abkühlen auf 60 °C direkt vor dem Ausgießen.

TB-Medium: 12 g/l Bacto-Tryptone
 24 g/l Hefe-Extrakt
 4 ml/l Glycerol
Salzlösung: 0,17 M KH_2PO_4
 0,72 M K_2HPO_4

TB-Medium und Salzlösung werden einzeln autoklaviert. Vor Gebrauch werden Salzlösung und TB-Medium im Verhältnis 1:10 gemischt. Die Zugabe von Ampicillin erfolgt wie für das LB-Medium beschrieben.

Die Kultivierung von Bakterien erfolgt als Flüssigkultur in den oben angegebenen Medien bei 37 °C unter Schütteln. Dazu werden 2-5 ml LB mit Bakterien von einer Agarplatte oder einem Glycerinstock angeimpft und 16 Stunden inkubiert. Kulturvolumen von über 5 ml werden aus einer 6-8 stündigen Vorkultur angeimpft. Zur Lagerung von Bakterien werden 0,5 ml einer sich in exponentiellem Wachstum befindlichen Kultur 1:1 mit Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. Eine Lagerung über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen erfolgt ausgestrichen auf LB-Agarplatten unter Selektionsdruck. Nach Inkubation für 16 Stunden bei 37°C erfolgt die Lagerung bei 4°C.

2.2.2 Herstellung elektrokompeter *E. coli* XL-1 Blue

Die Vorkultur von *E. coli* XL-1 Blue 4 ml LB-Medium wird für 16 Stunden inkubiert und damit eine Hauptkultur von 500 ml angeimpft. Nach weiterer Inkubation für 3-4 Stunden wird durch photometrische Messung die optische Dichte bei 600 nm ermittelt. Ist die OD von 0,7-0,8 erreicht, wird die Kultur 30 min auf Eis gekühlt. Es folgt eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 4000 x g. Das Pellet wird in 10 ml eiskaltem Wasser (bidest.) resuspendiert. Zentrifugation und Resuspension werden wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 10 ml 10 % Glycerol resuspendiert und 5 min bei 4 °C und 8000 x g zentrifugiert. Daraufhin wird das Pellet in 3,5 ml 10 % Glycerol aufgenommen. Es werden Aliquots von 50 µl auf vorgekühlte Eppendorf-Gefäße verteilt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.3 Transformation mittels Elektroporation

Zur Replikation von Plasmiden erfolgt die Transformation von *E. coli* XL1-Blue mit Plasmid-DNA. Eine Ampicillinresistenz zur anschließenden Selektion wird dabei über das Plasmid vermittelt.

Je 50 µl noch gefrorener elektrokompenter *E. coli* Bakterien werden 3 µl frisch ligiertes oder 1 µl *supercoiled* Plasmid (1 ng/µl) zugegeben. Dieser Ansatz wird in eine eisgekühlte Transformationsküvette mit 0,1 cm Schichtdicke gegeben. Unter Anlegen einer Spannung von 2500 V für etwa 4 s findet die Elektroporation statt, während der die Plasmid-DNA von den Bakterien aufgenommen werden kann. Direkt im Anschluss werden 300 µl LB-Medium zugegeben. Soll eine Blau-Weiß-Detektion erfolgen (vgl. 2.2.9.), so werden 16 µl X-Gal und 4 µl IPTG zupipettiert. Die Bakterien werden auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden gewachsene Kolonien ausgezählt und die Transformationseffizienz bestimmt.

2.2.4 Plasmidisolierung

2.2.4.1 Analytische Plasmidisolierung

Zur Kontrolle von Klonierungen wird Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aus Bakterienkultur isoliert. 2 ml TB/Ampicillin werden angeimpft und 16 Stunden inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 4 min bei 1500 x g wird das Pellet in 200 µl GET-Puffer vollständig resuspendiert. Anschließend werden nacheinander 400 µl Denaturierungslösung und 300 µl Renaturierungslösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Durch die anschließende Zentrifugation für 10 min bei 18000 x g wird bakterielle genomische DNA mit bakterieller Zelldebris pelletiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wird mit 500 µl Isopropanol in einer Zentrifugation für 7 Minuten bei 18000 x g gefällt. Nach dem Trocknen wird das Pellet in 100 µl TE-Puffer mit RNase aufgenommen.

GET-Puffer:	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	10 mM	EDTA
Denaturierungslösung:	0,1 M	NaOH
	1 %	SDS
Renaturierungslösung:	7,5 M	Ammonium-Acetat
TE-Puffer mit RNase:	10 mM	Tris/HCl; pH 7,5
	1 mM	EDTA
	10 µg/ml	RNase

2.2.4.2 Plasmidisolierung zur Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA zur Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte anhand des HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Im Vergleich zur analytischen Plasmidisolierung kann auf diese Weise ein höherer Reinheitsgrad und ein größeres Volumen erreicht werden. Äquivalent zur analytischen Plasmidisolierung folgt dabei auf die alkalische Lyse bakterieller Zellen das Ausfällen von Proteinen. Die Plasmid-DNA wird anschließend unter niedrig-Salz-Bedingungen und saurem pH-Wert an ein Säulenmaterial gebunden. Mit einem Waschpuffer mit mittlerer Salzkonzentration werden RNA, Proteine und weitere Verunreinigungen von geringem Molekulargewicht entfernt. Die Plasmide werden mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration eluiert. Über eine Isopropanolfällung wird die Plasmid-DNA aufkonzentriert und entsalzt. Nach erneutem Waschen mit 70 % Ethanol erfolgt die Elution mittels TE-Puffer.

2.2.5 Restriktionsverdau

Der Verdau durch Restriktionsendonukleasen erzeugt in der DNA-Sequenz Schnitte an definierten Basenfolgen. Diese Eigenschaft wird zur Charakterisierung von Plasmiden sowie zur Rekombination von DNA im Rahmen von Klonierungen eingesetzt.

Für Klonierungen werden 5 µg DNA mittels 50 u Restriktionsendonuklease in einem Volumen von 50-100 µl verdaut, während für analytische Zwecke 0,3 µg DNA und 10 u Restriktionsendonuklease in 20 µl Volumen eingesetzt werden. Der Verdau erfolgt bei 37 °C für etwa 60 min. Entsprechende Puffer wurden nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Im Fall von Verdau mit mehreren Restriktionsenzymen wurden entsprechende Puffer nach Herstellerangaben angepasst. Produkte des Verdaus können mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt werden.

2.2.6 Elution von DNA Fragmenten aus einem TAE-Agarose-Gel

Über Gelelektrophorese getrennte DNA-Fragmente können einzeln aus dem Gel eluiert und anschließend z.B. in einer Klonierung eingesetzt werden. Dazu wird das entsprechende Fragment unter UV-Licht detektiert, aus dem Gel ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction (Qiagen) Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Methode beruht auf dem Auflösen des Agarosegels und der Bindung der DNA Fragmente an Säulenmaterial. Nach mehrfachem Waschen erfolgt die Elution in Wasser oder TE-Puffer.

2.2.7 Klonierung

Die Subklonierung von PCR Produkten erfolgt in den linearisierten pGEM-T-Easy Vektor (Promega) mittels TA-Klonierung. Diese Technik nutzt die Präferenz von Taq-Polymerasen,

ein Adenin an das 3'-Ende von PCR-Produkten anzuhängen. 5'-Thymin-Überhänge des Vektors ermöglichen eine schnelle Ligation. Der Vektor vermittelt Ampicillinresistenz und ermöglicht blau-weiß-Screening. Die Insertionsstelle des Vektors ist innerhalb des lacZ-Gens positioniert, das für das Enzym β -Galactosidase codiert. Diese spaltet unter Zugabe von IPTG das Substrat X-Gal, woraufhin 5-Brom-4-chlor-indoxyl frei vorliegt, welches unter Einwirkung von Sauerstoff aus der Luft zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Bakterienkolonien mit intaktem β -Galactosidase-Gen sind daher blau gefärbt. Ist eine erfolgreiche Insertion in den Vektor erfolgt, tritt diese Reaktion nicht auf.

Die Klonierung in eukaryotische Expressionsvektoren erfolgt nach spezifischem Restriktionsverdau der Ausgangsvektoren. Zur Klonierung von cDNA der jeweiligen Gene wurden an Start- und Stopp-Codon der Sequenzen Restriktionsschnittstellen angehängt, da die in der PCR eingesetzten Primer die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen MluI (jeweils vor dem Start-Codon) bzw. ApaI (jeweils nach dem Stopp-Codon) enthalten. Auf diese Weise ist es möglich, die cDNA mithilfe von standardisiertem Restriktionsverdau in verschiedene Expressionsvektoren zu klonieren. cDNA-Insert- und Vektorfragmente werden nach dem Verdau in einem Agarosegel aufgetrennt (2.4.6), daraus eluiert (2.2.6) und im Verhältnis 1:1 bis 2:1 mittels T4 DNA Ligase und entsprechendem Puffer über Nacht bei RT in einem Volumen von 10 μ l ligiert. Anschließend erfolgt zur Entsalzung nach der Zugabe von 15 μ l Wasser eine Fällung mittels 250 μ l N-Butanol. Präzipitierte Plasmide werden in 10 μ l Wasser aufgenommen und zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt.

2.2.8 Erstellung verkürzter cDNAs

Zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen wurde die klonierte cDNA-Sequenz des Gens MLH3 definiert verkürzt. Der Ausgangsvektor pMC-G-MLH3-P (2.1.7) enthält wie beschrieben Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme MluI und ApaI flankierend zur WT-cDNA-Sequenz von MLH3. Um ein Plasmid zu klonieren, welches cDNA codierend für eine N-terminal verkürzte Proteinversion enthält, wurde ein Primer äquivalent zu den Basenpaaren 507-534 der cDNA von MLH3 erstellt (MLH3 del.N Forw, Tab.2.8). An das 5'-Ende wurde neben einem ATG-Triplett (Start-Codon) die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym MluI angehängt. Infolge einer PCR-Reaktion mit Ausgangsvektor als Template und den Primern MLH3del.N Forw und MLH3 XbaI Rev (Tab.2.8) wurde ein Fragment von 1086 bp kloniert, welches die eingefügte Restriktionsschnittstelle enthält. Durch Restriktionsverdau der Vektoren mit MluI und XbaI wurde der Transkriptionsstart des Ausgangsvektors durch die um 507 bp verkürzte Version ersetzt. Das entstandene Plasmid wurde mit pMC-G-MLH3del.N-P bezeichnet.

Die Herstellung einer C-terminal verkürzten Version der MLH3-cDNA erfolgte äquivalent zur Herstellung von pMC-G-MLH3del.N-P. Der entworfene rückwärtsgerichtete Primer (MLH3del.C Rev, Tab.2.8) bindet die Basenpaare 4173-4179 und enthält am 5'-Ende neben einem TGA-Triplett (Stopp-Codon) die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *ApaI*. Die PCR erfolgte mit Ausgangsvektor als Template und den Primern MLH3del.C Rev und MLH3 *XhoI* Forw (Tab.2.8). Das Amplicon der Größe 872 bp wurde über Restriktionsverdau mit *ApaI* und *XhoI* in den Ausgangsvektor kloniert. Auf diese Weise wurde die Sequenz C-terminal um 165 bp verkürzt. Das entstandene Plasmid wurde mit pMC-G-MLH3del.C-P bezeichnet.

Weiterhin wurde ein gerichteter Aminosäureaustausch innerhalb der cDNA von MLH3 vorgenommen. Dazu wurden zwei Primer entworfen. Der vorwärtsgerichtete Primer MLH3mutATP Forw bindet an die Basenpaare 50-88 der cDNA-Sequenz und enthält eine Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *XcmI* sowie den Basenaustausch A84C. Diese Mutation führt durch Veränderung des Triplettcodes gezielt zu dem Aminosäureaustausch Glu28Ala (s. 3.2). Der rückwärtsgerichtete Primer MLH3mutATP Rev bindet die Basenpaare 391-428 und enthält eine Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *AfeI* sowie die Basenaustausche A396T und A399G. Diese verändern die codierte Aminosäuresequenz nicht (sogenannte *silent mutations*), führen aber eine zusätzliche Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SphI* in die cDNA-Sequenz ein. PCR-Produkte dieser Primer unter Verwendung des Templates pMC-G-MLH3-P führen zu einem Amplicon der Größe 378 bp. Nach der Subklonierung erfolgt die Überprüfung hinsichtlich der Polymorphismen über Sequenzierung. Mittels Restriktionsverdau durch die Enzyme *XcmI* und *AfeI* wird das Fragment in den Ausgangsvektor kloniert. Das klonierte Plasmid pMC-G-MLH3mutATP-P kann aufgrund der eingefügten Erkennungssequenz durch Restriktionsverdau mit *SphI* vom Ausgangsvektor unterschieden werden.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Kulturmedien und Lösungen

Den Zellkulturmedien DMEM, Ham F12, McCoy's 5A, MEM, Opti-MEM, Iscove's MDM und RPMI 1640 wird 10-20 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (*fetal bovine serum* - FBS) zugesetzt, um die Medien unter anderem mit Cytokinen, Anheftungsfaktoren und weiteren Nährstoffen anzureichern (Tab.2.10). Weiterhin enthalten einige Medien Zusätze wie L-Glutamin, nicht essentielle Aminosäuren (NEAS), Natriumpyruvat, humanes Interleukin 2 (IL-2) und/oder die Antibiotika Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep). Um

Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wird für jede Zelllinie eine eigene Flasche mit Medium angesetzt. Das Waschen von Zellen sowie die Resuspension von Zellpellets erfolgt in PBS.

PBS: 8,0 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 1,44 g/l Na₂HPO₄·2H₂O
 0,2 g/l KH₂PO₄

PBS wird auf pH 7,2 eingestellt und autoklaviert.

2.3.2 Kulturbedingungen

Den Kulturbedingungen der einzelnen Zelllinien entsprechend (DSMZ, www.cellines.de) werden die Zellen in Gewebekulturplatten mit 24, 12 oder 6 Näpfen bzw. in Gewebekulturflaschen von 25 cm², 80 cm² oder 175 cm² Bodenfläche kultiviert. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5-10 %. Ein Gasaustausch findet über leicht geöffnete Schraubverschlüsse der Kulturflaschen statt. Um das Auswachsen von Seitenlinien zu verhindern wird die Kultivierung auf maximal zwei Monate begrenzt.

2.3.3 Passagieren von Monolayerkulturen

Adhärente Zelllinien werden in Monolayern kultiviert. Bevor im verwendeten Kulturgefäß Konfluenz erreicht wird, werden diese abgelöst, verdünnt und erneut ausgesät. Das Ablösen der adhären Zellen erfolgt mithilfe des proteolytischen Enzyms Trypsin. Um die Beeinträchtigung der Wirkung durch serumhaltiges Medium zu umgehen, werden die Zellen zuvor mit PBS gewaschen. Nach mehrminütiger Inkubation in Trypsin werden die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes abgeschlagen und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Der Trypsinisierungsprozess wird durch Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt.

Die Zelllinie 293 wird an Stelle von Trypsin mit einer Hochsalzlösung (TEN) abgelöst. Sobald die Zellen vereinzelt sind, wird Kulturmedium zugegeben. Anschließend werden die Zellen pelletiert und in frischem Medium ausgesät.

TEN: 40 mM Tris/HCl; pH 7,5
 1 mM EDTA; pH 8,0
 150 mM NaCl

TEN wird autoklaviert.

2.3.4 Passagieren von Suspensionskulturen

Suspensionskulturen werden verdünnt, indem frisches Medium zugegeben wird. Alternativ kann ein Mediumwechsel auch nach Zentrifugation der Kultur oder durch vorsichtiges Abpipettieren von überschichtendem Medium sedimentierter Zellen erfolgen.

2.3.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Konservierung und Lagerung von Zelllinien findet bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff statt. Um die Kristallbildung sowie die partielle Dehydratation des Cytoplasmas zu verhindern, enthält das Einfriermedium neben 70 % des entsprechenden Basismediums und 20 % FBS auch 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Je $1\text{--}10 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium werden in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese Röhrchen werden in Kryoboxen langsam auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt und nach ca. 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen werden die Zellen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad erwärmt und zum zehnfachen Volumen Kulturmedium gegeben, um eine Ausdünnung von DMSO zu erreichen. Zur vollständigen Entfernung von DMSO werden die Zellen pelletiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und in adäquate Gewebekulturgefäße ausgesät.

2.3.6 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Zur Bestimmung der Zellzahl und Viabilität von Zellkulturen werden diese mit dem Farbstoff Trypanblau behandelt, welcher exklusiv abgestorbene Zellen färbt. Nach dem Versetzen einer homogenen Zellsuspension mit gleichem Volumen Trypanblau wird diese nach kurzer Inkubation in eine Zählkammer (Neubauer, improved) pipettiert und die Anzahl lebender und toter Zellen ermittelt. Die Angabe Zellzahl/ml ergibt sich aus der Zahl lebender Zellen in zwei Quadranten der Zählkammer multipliziert mit $1 \cdot 10^4$. Die Viabilität gibt prozentual die relative Anzahl lebender zu toter Zellen an.

2.3.7 Stabile Transfektion humaner Zelllinien

Zur Transfektion humaner Zelllinien wurde das SuperFect Transfection Reagent (Qiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt. Die sogenannte Lipofektion beruht auf dem Einschluss der zu transfizierenden DNA in Liposomen, welche mit der Membran der zu transfizierenden Zellen verschmelzen und auf diese Weise die DNA in die Zelle einbringen.

Stabile Transfektion wurde an den Zelllinien 293, 293T und HT-1080 durchgeführt. Nach Aussaat von je $2 \cdot 10^5$ (293), $1 \cdot 10^5$ (293T) bzw. $4 \cdot 10^5$ (HT-1080) Zellen in Gewebekulturschalen (\varnothing 10cm) und Kultivierung über Nacht, erfolgte ein Mediumwechsel. Im Folgenden werden bei der Etablierung von Einzelklonen die Antibiotika Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) eingesetzt, um Kontamination vorzubeugen. Ein Ansatz aus 130 μl Basismedium, 5 μg zu transfizierender Plasmid-DNA und 25 μl SuperFect Transfection Reagent wird sofort nach Zugabe letzterem für 10 s gevortext und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Nach dem Auffüllen auf 1 ml Gesamtvolumen mit serumhaltigem Medium wird der Ansatz zu den Zellen gegeben. Je nach Viabilität der Zellen werden nach 24-48 Stunden die

Zellen in Selektionsmedium passagiert, welches zusätzlich Puromycin in einer empirisch bestimmten Konzentration enthält (0,4 µg/ml für HT-1080; 0,7 µg/ml für 293 und 293T). Nach etwa 14 Tagen sind mit dem bloßen Auge Kolonien von Zellen sichtbar, die auf eine einzelne, transfizierte Zelle zurückzuführen sind und damit einen Einzelklon darstellen. Diese werden mit einer Mikropipette aufgenommen und in eine 96-Well-Platte überführt. Sobald die Zellen adhärent sind und wachsen, wird die Hälfte der Zellen auf eine zweite 96-Well-Platte überführt. Ist eine ausreichende Menge an Zellen verfügbar, wird das Medium einer Platte entfernt und die Zellen durch den Kunststoffboden der Mikrotiterplatte am Epifluoreszenzmikroskop auf Fluoreszenz hin untersucht. Eine Selektion erfolgt anhand der Fluoreszenzintensität. Die zwei stärksten Einzelklone werden aus der nicht mikroskopierten Platte heraus expandiert. Bei sämtlichen Arbeiten mit transfizierten Einzelklonen wird der Selektionsdruck aufrechterhalten.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 DNA-Isolierung aus humanen Zellen

Die Isolierung genomischer DNA aus humanen Zelllinien erfolgte mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers. Nach der Lyse der Zellen in Anwesenheit von Proteinase K und dem chaotropen Salz Guanidinium-HCl werden Nukleinsäuren an einen Filter gebunden und über verschiedene Waschschrte von Salzen, Proteinen und weiteren Verunreinigungen gereinigt. Die Elution erfolgt in Wasser (bidest.) oder TE-Puffer.

2.4.2 RNA-Isolierung aus humanen Zellen

Zur Isolierung von RNA werden $5 \cdot 10^6$ Zellen 4 min bei 180 x g pelletiert und mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 1 ml Trizol (Invitrogen) resuspendiert. Nach Inkubation für 5 min bei RT werden 200 µl Chloroform dazugegeben und der Ansatz invertiert. Auf eine Inkubation für 3 min bei RT folgt eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13000 x g. Die RNA liegt in der oberen der entstehenden Phasen vor und wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Fällung mit 500 µl Isopropanol folgt eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13000 x g. Die RNA wird mit 70 % Ethanol gewaschen, wie zuvor abzentrifugiert und anschließend getrocknet. Abschließend wird das Pellet in 100 µl Wasser (bidest.) aufgenommen.

Nach der Kontrolle der RNA-Isolierung über Gelelektrophorese und photometrischer Bestimmung werden zu der RNA-Lösung 10 µl 4 M LiCl (pH 5) und 300 µl 100 % Ethanol gegeben. Auf diese kann die RNA bei -20 °C mehrere Monate gelagert werden. Die RNA Isolierung mit Trizol basiert auf dem Protokoll von Chomczynski & Sacchi (1987).

2.4.3 Quantität- und Qualitätsanalyse isolierter Nukleinsäuren

Die Quantifizierung isolierter DNA und RNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) mit dem Nanodrop-Photometer. Zur Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration in µg/ml wird die OD_{260} mit dem Faktor 50 (DNA) bzw. 40 (RNA) multipliziert. Diese Methode ist für eine $OD < 2$ gültig. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt den Grad möglicher Proteinkontaminationen. Bei einer Nukleinsäurelösung, die frei von Proteinen ist, beträgt dieses Verhältnis 1,8-2,0.

Weiterhin kann durch Gelelektrophorese isolierter Nukleinsäuren deren Konzentration und Qualität abgeschätzt werden. Die Verwendung definierter Mengen an Größenstandards erlaubt nach Dokumentation eine softwaregestützte Quantifizierung (Kodak MI). Trizol-aufgereinigte RNA zeigt nach Auftrennung im Agarosegel ein spezifisches Bandenmuster der ribosomalen RNA, was Rückschlüsse auf etwaige Degradierung oder Kontamination mit DNA ermöglicht.

2.4.4 cDNA-Synthese

Die Synthese von komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA) aus RNA erfolgt unter Verwendung der SuperScript II Reverse Transcriptase von Invitrogen. 5 µg in Ethanol gelagerter RNA (vgl. 2.4.2) werden 20 min bei 4 °C und 13000 x g zentrifugiert. Dem Waschen des Pellets mit 70 % eiskaltem Ethanol folgt eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 13000 x g und das Trocknen des Pellets. Nach Zugabe von 11 µl Wasser (bidest.) und 1 µl Random Primern (50 µg/ml; Invitrogen) wird der Ansatz 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5x First-Strand Buffer (Invitrogen), 1 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTPs erfolgt die Inkubation für 2 min bei 42 °C. Nach Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase folgt eine Inkubation für 50 min bei 42 °C. Abschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 3 min bei 75 °C gestoppt. Die cDNA wird bei -20 °C gelagert.

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* - PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die PCR eingesetzt. Gesteuert über eine Abfolge von Temperaturen in einem Thermozykler werden dabei die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation zyklisch wiederholt. Der Begriff Kettenreaktion

beschreibt in diesem Zusammenhang, dass die Produkte vorheriger Zyklen wiederum im Folgenden eingesetzt werden und somit eine exponentielle Reaktion ermöglichen. Die Denaturierung beschreibt das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen und die damit verbundene Trennung des DNA-Doppelstrangs. Beim Annealing binden 20-30 Nukleotide lange Oligonukleotide (Primer, s. Tab. 2.8) an spezifischen Sequenzen auf beiden Einzelsträngen und ermöglichen so die von der Polymerase durchgeführte Elongation jeweils in 5'-3' Richtung. Dieser Zyklus wird 35-mal wiederholt. In dieser Arbeit wurde folgendes Protokoll angewandt:

Wasser (bidest.)	18,375 µl
10x PCR Puffer (Takara)	2,5 µl
dNTPs (jeweils 2,5 mM; Takara)	1,0 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
Polymerase (5 units/µl; TaKaRa Taq Hot Start Version)	0,125 µl
Template	1,0 µl

Temperaturprogramm:

Zyklus	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Bemerkungen
1 (1x)	1	95	03:00	
2 (35x)	1	94	00:04	
	2	vgl. Tab. 2.8	00:30	
	3	72	01:30	[1]
3 (1x)	1	72	10:00	
4 (1x)	1	20	∞	

[1] Erhöhung der Dauer des Annealings nach jedem Zyklus um 2 s

Die Amplifikation von cDNA-Sequenzen mittels PCR wird als Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) bezeichnet. Zur Kontrolle der cDNA-Qualität jeder einzelnen Probe und dem Ausschluss der Verunreinigung durch gDNA wird eine PCR mit den Primern ABL Forw und ABL Rev durchgeführt (Tab.2.8). Diese Primer überspannen ein Intron der Gensequenz des Gens ABL. Da cDNA im Gegensatz zu genomischer DNA (gDNA) keine Introns enthält, kann die Amplifikation von cDNA und gDNA anhand der Amplicongröße unterschieden

werden. Die Verwendung von cDNA als Template liefert dabei ein Amplicon der Größe 216 bp, nach Einsatz von gDNA kann ein Fragment der Größe 779 bp detektiert werden.

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Durch elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel können Fragmente voneinander getrennt und Sequenzgrößen abgeschätzt werden. Das Ladeverhalten ist dabei abhängig von Größe und Konformation der Nukleinsäure, der Dichte des Gels und der anliegenden Spannung. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgt in TAE-Puffer:

TAE-Puffer (50x): 242 g/l Tris/HCl; pH 7,8
 57,1 ml/l Essigsäure (100 %)
 100 ml/l EDTA; pH 8,0

TAE-Puffer wird mit 1-3 % Agarose versetzt und erhitzt, bis sich die Agarose gelöst hat. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wird der Farbstoff Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml hinzugegeben. Vor der Beladung des Gels werden Proben mit 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt. Zur Charakterisierung von Nukleinsäuren werden die DNA-Größenstandards GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas) und/oder 1kb DNA Ladder (Invitrogen) verwendet. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren, wodurch sich einerseits das Absorptionsspektrum verändert und andererseits die Intensität der Emission stark zunimmt. Daher können die Nukleinsäurefragmente nach Anregung mit UV Licht über die Fluoreszenz von Ethidiumbromid detektiert werden.

2.4.8. Sequenzierung von cDNAs

Zur Sequenzierung der aus TA-Klonierungen erhaltenen Plasmide wurden die Sequenzierungsprimer T7 und SP6 eingesetzt, die an entsprechende RNA Polymerase Promotoren des pGEM-T-Easy Vektors binden. Zur Sequenzierung der DNA von MSH4 und MSH5 wurden die Primer der Transkriptanalyse verwendet (Tab.2.8). Der Sequenzabgleich erfolgte anhand der entsprechenden Datenbank-Sequenzen (Tab.3.1) mit dem Programm VectorNTI (Invitrogen). Die sequenzierten cDNAs zeigten mehrere Abweichungen von der entsprechenden Referenzsequenz, wobei es sich entweder um auf genomischer Ebene manifestierte Veränderungen oder um Fehler, die bei der Amplifikation der einzelnen Fragmente entstanden sind, handeln kann. Mittels Datenbankabgleich (Ensembl) konnten diese zum Teil als *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), welche die Funktionen des entsprechenden Proteins nicht beeinträchtigen, identifiziert werden. Für die weiteren Basenaustausche kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich ebenfalls um SNPs handelt, die bisher nicht beschrieben wurden. Anhand beschriebener funktioneller Domänen der

entsprechenden Proteine kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass von diesen Substitutionen konservierte, und damit in ihrer Funktion bedeutende Bereiche, von den Austauschen betroffen sind.

Tab. 2.11: Übersicht über die Basenaustausche in den für die Klonierungen verwendeten cDNAs. Aufgeführt sind die Basenaustausche und die daraus resultierenden Aminosäureaustausche der eingesetzten cDNAs. SNP: *single nucleotide polymorphism*; s: kein Aminosäureaustausch, *silent mutation*.

	Basenaustausche	Aminosäureaustausche
MLH1	T2054C	Phe683Ser
	A1643G	Lys548Arg
PMS2	A1952G	Lys651Arg (SNP)
	T2253C	s (SNP)
	A2324G	Asn775Ser (SNP)
	T2489C	Leu830Pro
PMS1	G1485A	s
	A1144G	Asn382Asp
MLH3 WT	A2043G	Asn678Ser
	A2478G	Asn826Asp (SNP)
	T2577C	Phe859Leu
	G3514A	Ile1172Val
MLH3 V1	A3435G	s (SNP)
MLH3 V2	A3435G	s (SNP)
MLH3 V3	T3450C	s

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Bestimmung des Proteinengehalts von Zelllysaten

Um in vergleichenden Studien gleiche Mengen Protein einzusetzen, ist eine Quantifizierung des Gesamtproteingehalts der Lysate notwendig. Die Bestimmung wurde nach Bradford durchgeführt. Der verwendete Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 bildet in saurer Lösung Komplexe mit Proteinseitenketten, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm zur Folge hat. Diese kann im Spektralphotometer detektiert werden. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgt im Abgleich mit einer Standardreihe definierter Proteinmengen (Rinderserumalbumin, *bovine serum albumine*, BSA). Zu 4,9 ml Bradfordreagenz werden 100µl eines 1:100 in BSA verdünntem Zelllysate gegeben, gemischt und exakt 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Mischen wird die Absorption bei 595 nm gemessen.

Bradfordreagenz: 50 ml/l Ethanol abs.
100 mg/l Coomassie Brilliant Blau G250
100 ml/l 85 % ortho-Phosphorsäure
850ml/l Wasser (bidest.)

2.5.2 Western Blot

Der Western Blot beschreibt die Übertragung von Proteinen von einem Gel auf eine Trägermembran, was einen spezifischen Proteinnachweis ermöglicht. Dem Prozess gehen die Herstellung von Zelllysaten und die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) voraus. In dieser Arbeit wird die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecyl sulfate*) angewandt. $1 \cdot 10^6$ Zellen werden dazu für 4 min bei 180 x g pelletiert, zweimal in PBS gewaschen und schließlich in 50 µl PBS aufgenommen. Anschließend werden zur Denaturierung der Nukleinsäuren und Proteine 200 µl 2x SDS-Probenpuffer hinzugefügt und die Probe für 10 min bei 100 °C inkubiert. Das Detergenz SDS überdeckt die Eigenladungen der Proteine, so dass alle Proteine eine negative Ladung aufweisen. β-Mercaptoethanol wird zur Denaturierung der Proteine, insbesondere der Trennung von Bisulfid-Brückenbindungen eingesetzt.

2x SDS-Probenpuffer: 25 ml 4x Tris-Puffer (pH 6,8)
20 ml Glycerol
4 g SDS
0,1 mg Bromphenolblau
1 ml β-Mercaptoethanol
ad 100 ml Wasser (bidest.)

Das Polyacrylamid-Gel besteht aus Sammelgel und Trenngel. Die Trenneigenschaft erhöht sich mit dem Anteil an Acrylamid/Bisacrylamid. Die Polymerisierung beruht auf der Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) sowie des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethylendiamin (TEMED).

Trenngel (7 %): 3,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %; 37,5:1)
3,75 ml 4x Tris (pH 6,8)
7,75 ml Wasser
200 µl APS (10 %)
40 µl TEMED

Sammelgel (3,6 %) 650 µl Acrylamid/Bisacrylamid (30 %; 37,5:1)
 1,25 ml 4x Tris (pH 8,8)
 3,05 ml Wasser
 50 µl APS (10 %)
 10 µl TEMED

Nach dem Gießen des Trenngels wird es mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Abschlusskante zu erhalten. Nach der Polymerisation wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen. 10 µl Zelllysate, entsprechend $4 \cdot 10^4$ Zellen, werden in der Elektrophorese eingesetzt, die für mindestens 60 min bei 100 V durchgeführt wird. Der Elektrophoresepuffer wird auf 4°C gekühlt eingesetzt.

Elektrophoresepuffer (5x): 30 g/l Tris
 144 g/l Glycin
 5 g/l SDS

Anschließend werden die Proteine mittels halbtrockenen ElektrobloTTings (*semidry electroblotting*) auf eine PVDF Membran transferiert, wobei das Auftrennungsmuster erhalten bleibt. Das Blotting erfolgt bei einer Spannung von 25 V und einer Stromstärke von maximal 4 mA/cm² in Semidry Blotting Puffer.

Semidry Blotting Puffer: 2,93 g/l Glycin
 0,375 g/l SDS
 5,82 g/l Tris
 20 % Methanol

Freie Bindungsstellen der Membran werden anschließend durch Inkubation mit PBS + 4 % BSA für 1 Stunde blockiert. Daraufhin wird die Membran nacheinander mit in PBS + 0,4 % BSA vorliegendem Erstantikörper, Zweitantikörper (2.1.4) und ggf. Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*) inkubiert. HRP bindet über eine Streptavidin-Biotin-Bindung an den Zweitantikörper oder ist direkt daran gekoppelt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wird die Membran jeweils 15 min in PBS + 0,1 % Tween20 gewaschen. Die Inkubation mit Erstantikörper erfolgt für 16 Stunden, die mit Zweitantikörper für 1 Stunde. Nach einem finalen Waschschrift für 30 min wird die Membran 1 min lang mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent (PerkinElmer LAS, Inc.) inkubiert, woran die Belichtung eines Röntgenfilms und dessen Entwicklung anschließt. Auf dem Röntgenfilm wird dabei die durch HRP vermittelte Lumineszenz detektiert. Durch Abgleich mit dem Größenstandard auf der

Membran kann die Größe der aufgetragenen Proteine abgeschätzt werden. Molekulare Größen der in dieser Arbeit immunologisch untersuchten Proteine sind in Tab.2.11 aufgeführt.

Der GFP-spezifische Antikörper bindet neben GFP auch CFP und YFP mit gleicher Effizienz und wurde daher für die Detektion aller drei Fluoreszenzproteine verwendet.

Tab. 2.12 Molekulare Größen der in dieser Arbeit immunologisch untersuchten Proteine.

Die errechneten Proteingrößen beruhen auf Informationen der Datenbank UniProtKB.

Protein	Molekulare Größe [kDa]
MLH1	84,601
MLH3	163,712
MSH2	104,743
MSH3	127,44
MSH4	104,756
MSH5	92,875
MSH6	152,786
PMS2	95,798
PMS1	105,83
PCNA	28,769
CFP/GFP/YFP/TagRFP/mCherry	26,9
GFP/TagRFP-MLH1	111,501
GFP/TagRFP-MLH3	190,612
YFP/mCherry-MSH4	131,656
CFP/GFP-MSH5	119,775
GFP-PMS2	122,698
GFP-PMS1	132,73
TagRFP-PCNA	55,669

2.5.3 Immunfärbung

Zur Färbung endogener Proteine in humanen Zellen wurde Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Adhärenente Zellen wurden in Kammerobjektträgern (LabTek) kultiviert. Nach Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Fixierung in 4 % Paraformaldehyd für 15 min bei 37°C. Nach 2 fachem Waschen mit PBS folgte die Permeabilisierung der Zellmembran durch Inkubation in Permeabilisierungspuffer über Nacht bei 4°C. Nach 2 fachem Waschen mit PBS erfolgte analog zum Western Blot eine Blockierung mittels IF-Blockierungslösung für 2 Stunden. Nach Vorinkubation in PBS versetzt mit 1%FBS für 1 Stunde wurde der Erstantikörper 1:500 in PBS/1%FBS/0,1%Tween20 verdünnt für 2 Stunden appliziert. Nach 3

fachem PBS-Waschen für je 15 min wird der fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper 1:600 in PBS/1%FBS/0,1%Tween20 verdünnt für 2 Stunden auf die Membran gegeben. Nach 2 PBS-Waschschritten für je 15 min werden die Kammern der Objektträger entfernt und das Präparat mit einem Deckglas versehen. Die Fluoreszenz wird mittels Epifluoreszenzmikroskopie detektiert.

Permeabilisierungslösung:	0,1 M	Tris/HCl pH 7,4
	50 mM	EDTA pH 8
	0,5 %	TritonX-100
IF-Blockierungslösung:	3 %	BSA in 4xSSC
	0,1 %	Tween20

2.5.4 Affinitätschromatographie

Durch spezifische Immobilisierung von Proteinkomplexen an eine stationäre Phase können nach der Elution Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden. In dieser Arbeit wurden rekombinante Proteine in Fusion mit einem Hexa-Histidin-tag exprimiert, welcher eine hohe Affinität zu Metallionenchelaten wie Ni^{2+} -NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) aufweist. Um Protein-Protein-Bindungen aufrechtzuerhalten, wurde eine native Lysis der Zellen durchgeführt. Dazu werden $5 \cdot 10^8$ Zellen in 7 ml Lysispuffer aufgenommen und 45 min auf Eis inkubiert. Der Lysispuffer enthält verschiedene Proteinaseinhibitoren um einem Abbau der Proteine während des Versuchs vorzubeugen. Einer Ultraschallbehandlung (B.Braun Labsonic U Ultraschallhomogenisator mit Ø 4mm) für 60 Sekunden auf Eis folgen zwei Zentrifugationsschritte für 10 min bei $1950 \times g$ und 4°C , um Zelldebris zu entfernen. Währenddessen wird eine Ni^{2+} -NTA-Sepharose-Durchflusssäule (*gravity flow column*, 1ml CV, IBA) mit 2 ml Equilibrierungspuffer durchlaufen lassen. Die hergestellten Zellextrakte werden auf die Durchflusssäule appliziert und der Durchfluss der Säule abgewartet. Nach 6 Waschschritten werden durch Verdrängung der Histidine vom Säulenmaterial mittels Imidazol die gebundenen Komplexe eluiert. Die Elution erfolgt in sechs Schritten, wobei die Eluate einzeln aufgefangen und mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt werden. Eine anschließende PAGE und Western Blot Analyse (2.5.2) kann mithilfe eines Antikörpers gegen das His-tag-Protein das Eluat ermitteln, welches die Proteinfraction enthält. Western Blot mittels weiterer Antikörper (2.1.4) kann weitere Proteine des Eluats, und damit Bindepartner des His-tag-Proteins, identifizieren.

Lysispuffer:	10 mM	Tris/Hcl pH 8
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	0,5 mM	DTT
	1 Tablette	Roche complete Protease Inhibitor
Equilibrierungspuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
Waschpuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
Elutionspuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
	1 Tablette	Complete Protease Inhibitor (Roche)

2.5.5 Co-Immunpräzipitation

Weiterhin wurden Protein-Protein-Interaktionen mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) untersucht. Die Bindung an die stationäre Phase erfolgt im Gegensatz zur Affinitätschromatographie (2.5.4) über Antikörper. Die Affinität von ProteinG gegenüber der Fc-Region von IgG-Antikörpern, wiederum gekoppelt an Sepharose, wird dabei zur Immobilisierung von Proteinkomplexen genutzt. In dieser Arbeit wurde die Co-IP mit einem GFP- sowie einem TagRFP-spezifischen Antikörper (2.1.4) und entsprechender Fusionsproteine unter Verwendung des Nuclear Complex Co-IP Kits (Active Motif) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch Anwendung dieses Kits findet zunächst eine Trennung der nukleären von der cytoplasmatischen Fraktion statt. Dies erlaubt eine differenzierte Untersuchung und erleichtert aufgrund erhöhter Konzentration die Detektion nukleärer Proteine. Die nachfolgend aufgeführten Puffer wurden anhand der Bestandteile des Kits angesetzt, wobei sich die angegebenen Mengen auf eine Probe von $1 \cdot 10^7$ Zellen beziehen.

Phosphataseinhibitorpuffer:	6,8 ml	Wasser (bidest.)
	0,8 ml	10x PBS
	0,4 ml	Phosphatase Inhibitor
Hypotonischer Puffer:	450 µl	Wasser (bidest.)
	50 µl	10x hypotonischer Puffer
Verdaupuffer:	98,5 µl	Verdaupuffer
	1 µl	Protease Inhibitor Cocktail (PIC)
	0,5 µl	PMSF (100 mM)
Co-IP Puffer:	400 µl	Wasser (bidest.)
	100 µl	5x IP Low Buffer
	2,5 µl	Protease Inhibitor Cocktail (PIC)
	2 µl	GFP Antikörper
Waschpuffer:	1,6 ml	Wasser (bidest.)
	400 µl	5x IP Low Buffer
	4 µl	Protease Inhibitor Cocktail (PIC)

Je Co-Immunpräzipitation werden 10^7 Zellen in Phosphataseinhibitor-Puffer aufgenommen, für 4 min bei 180 x g zentrifugiert und in hypotonischem Puffer resuspendiert. Nach Inkubation für 15 min auf Eis werden 25 µl Detergenz zugegeben um die Zellmembran zu zerstören. Nach Inkubation für 5 min werden die Zellkerne 30 sec bei 4 °C und 10000 x g pelletiert und in 100 µl Verdaupuffer mit 0,5 µl Enzymatic Shearing Cocktail aufgenommen. Durch Inkubation für 10 min bei 37 °C werden die Nuklei zerstört und die DNA fragmentiert. Die Reaktion wird mit 2 µl EDTA gestoppt, Membranreste durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 15000 x g pelletiert. Der Überstand, der die nukleären Proteine enthält, wird zu 500 µl Co-IP Puffer gegeben und mit GFP-Antikörper sowie 1 µl PMSF versetzt. Der Ansatz wird über Nacht im Über-Kopf-Schüttler bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag werden 50 µl in Waschpuffer gewaschene und resuspendierte ProteinG Sepharosebeads + 0,25 µl PIC zugegeben und 1 Stunde bei 4 °C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Sepharosebeads mit gebundenen Antikörper-Proteinen-Komplexen 30 sec bei 4 °C und 1500 x g pelletiert und in 500 µl Waschpuffer + 100 mg/ml BSA resuspendiert. Nach 2facher

Wiederholung folgt äquivalent 3faches Waschen der Beads in Waschpuffer ohne BSA. Abschließend werden die Beads in 20 µl 2x SDS-Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei 65°C inkubiert. Äquivalent zur Affinitätschromatographie (2.5.4) können spezifische Antikörper (2.1.4) nach PAGE und Western Blot (2.5.2) Proteine des Eluats, und damit Protein-Protein-Interaktionen, detektieren.

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie wird die emittierte Fluoreszenz aller Moleküle einer Zelle aufgenommen und die Fluoreszenzintensität erscheint infolgedessen relativ stark. Sie ist jedoch bezüglich der Bildschärfe und damit der Auflösung begrenzt, da die Fluoreszenz von Molekülen außerhalb der Brennebene die Fluoreszenz von Molekülen innerhalb der Brennebene überlagert. Epifluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss) in Verbindung mit der digitalen Kamera ES2 (Visitron Systems) erstellt.

2.6.2 Konfokale Mikroskopie

Hochauflösende Aufnahmen wurden am Laserscanning Mikroskop Zeiss LSM 510 Meta in Kooperation mit der Abteilung RDIF des Helmholtz Institut für Infektionsforschung, Braunschweig, durchgeführt.

Diese Art von Fluoreszenzmikroskop verwendet einen Laserstrahl, der den Fluoreszenzfarbstoff (oder das Fluoreszenzprotein) anregt, das Präparat Punkt für Punkt scannt und in Form eines digitalen Bildes ausgibt. Durch eine Lochblende (*pinhole*) wird Licht, das von außerhalb der Schärfeebene (Fokalebene) kommt, blockiert, was die Auflösung erhöht und ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise-ratio*) bietet. Beleuchtungs- und Beobachtungsstrahlengang liegen dabei übereinander und besitzen einen gemeinsamen Brennpunkt; sie sind konfokal. Die optische Aufteilung in Ebenen ermöglicht ein Fokussieren entlang der Z-Ebene und die Erstellung 3-dimensionaler Aufnahmen. In den Aufnahmen dieser Arbeit wurde das *pinhole* so eingestellt, dass die Fluoreszenz einer Ebene der Dicke 1-2 µm detektiert wurde.

Unter Berücksichtigung der Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzproteine (Tab.2.13) wurde GFP mit einem Argonlaser (Argon/2) der Wellenlänge 488 nm angeregt. Die Emission wurde durch einen Bandpassfilter (BP505-530) begrenzt. TagRFP und mCherry wurden mit einem Helium/Neon-Laser (HeNe1) der Wellenlänge 543 nm angeregt und die

Emission durch einen Langpassfilter (LP560) beschränkt. Weiterhin wurden im Strahlengang ein Hauptfarbteiler (HFTv364/488/514/534/633) und bei Detektion von zwei verschiedenen Emissionen ein NebenfARBteiler (NFT 545) eingesetzt.

Tab. 2.13 Übersicht über die Absorptions- und Emissionsmaxima eingesetzter Fluoreszenzproteine.

Fluoreszenzprotein	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
GFP	488 nm	507 nm
mCherry	587 nm	610 nm
TagRFP	555 nm	584 nm

2.6.3 Live-cell imaging

Sollen Zellen unter physiologischen Bedingungen am konfokalen Mikroskop beobachtet werden, müssen optimale Kulturbedingungen unter dem Mikroskop hergestellt werden. Weiterhin muss beim Mikroskopieren darauf geachtet werden, die Fluoreszenzproteine mit möglichst geringen Laserintensitäten anzuregen. Zu beobachtende Zellen werden in speziellen Kammerdeckgläsern (Borosilikatglas, LabTek) kultiviert und wachsen je nach Zelltyp am Boden dieser an. Eine das Präparat umschließende und mit dem Objektisch abschließende beheiz- und begasbare Inkubationskammer (ibidi) wird so eingestellt, dass die Temperatur am Boden des Kammerdeckglases auf 37°C gehalten wird. Dazu wird diese mit einem Messfühler direkt im Kulturmedium gemessen. Weiterhin wird das verwendete Objektiv mit einer Objektivheizung (Zeiss) auf 37°C geheizt. So wird verhindert, dass über Glasboden und Immersionsöl das Objekt direkt durch den Metallkörper des Objektivs abgekühlt wird. Der CO₂-Gehalt wird mit einem Gasmischer (ibidi) auf 10 % eingestellt.

2.6.4 UVA-vermittelter DNA-Schaden

Das Laserscanning Mikroskop Zeiss LSM 510 Meta kann über die bildgebenden und darstellenden Möglichkeiten hinaus auch als Plattform zur Induktion von DNA-Schäden genutzt werden. Dazu werden angeschlossene Laser so eingesetzt, dass ein definierter Bereich der Zelle über einen definierten Zeitraum belichtet wird. Der Argonlaser (coherent enterprise II argon ion laser) strahlt mit einer Laserlinie der Wellenlänge von 364nm im Bereich von UV-A Strahlung, die DNA Schäden unterschiedlicher Art auslösen kann (s. 4.4). In lebenden

Zellen akkumulieren DNA-Reparaturproteine verschiedener Reparaturmechanismen in Folge dieser Art von Schaden. Um die Formation distinkter Foci akkumulierender Fusionsproteine dokumentieren zu können, muss die Induktion von DNA-Schäden in derselben Fokalebene erfolgen, wie die Dokumentation. Eine annähernde Übereinstimmung der Fokalebenen von UV-Laser und dem zur Beobachtung verwendeten Laser wird mit Hilfe von motorisierten Kollimatoren am LSM eingestellt (Abb. 2.1).

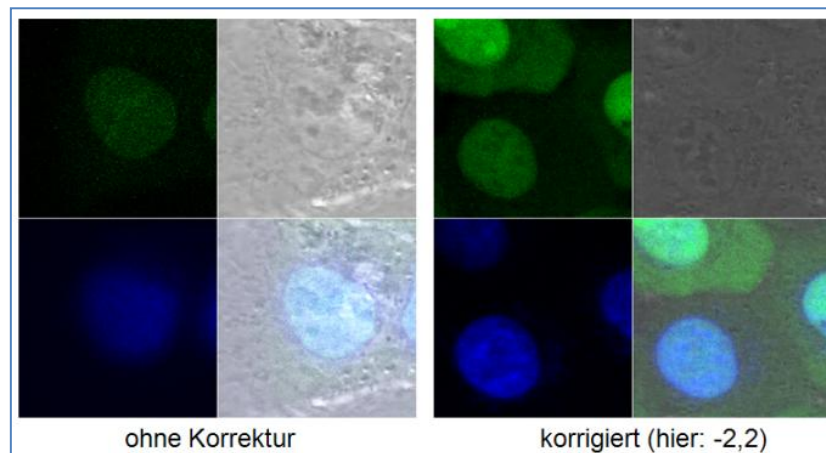


Abb.2.1 Einstellung übereinstimmender Fokalebenen von sichtbaren und ultravioletten Laserlinien mittels Kollimator. Dargestellt ist die Emission von GFP nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm (grün dargestellt), sowie die Emission des Farbstoffes DAPI nach Anregung mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 364 nm (blau dargestellt). Erst in Folge der Korrektur durch die Kollimatoren sind beide Fluoreszenzen fokussiert darstellbar.

Um DNA-Schäden durch UVA-Bestrahlung zu induzieren, wird das Objektiv Plan-Neofluar 40x/1,3oil (Zeiss) mit Immersionsöl (Zeiss Immersol 518 N) eingesetzt. Mithilfe der Software ZEN (Zeiss) wird eine einzelne Zelle mittels digitalem 8-fachen zoom fokussiert. Die Ausgangsleistung des UVA-Lasers wird auf 50 % begrenzt. Der Laserbeam erfolgt in 200 Zyklen (*iterations*) auf eine definierte Region von 100*10 px was einer Fläche 4,48 μm^2 entspricht. Dabei wird die Bildfläche in 512*512 px unterteilt dargestellt und die Lasergeschwindigkeit auf scanspeed=7 eingestellt.

Bei der Dokumentation der Akkumulation von DNA-Reparaturproteinen am Ort UV-induzierten DNA-Schadens, muss die exakte Überlagerung der Fokalebenen zusätzlich zur Einstellung der Kollimatoren empirisch ermittelt werden. Dazu werden schrittweise definierte Bereiche des Nucleus in Abständen von 0,5 μm entlang der z-Achse bestrahlt (Abb.2.2). Die ermittelte Abweichung der z-Ebene wird vor jedem Experiment eingestellt.

Eine Messung der Ausgangsleistung des UV-A Lasers erfolgte mit dem Ampere-Messgerät P-9710-2 (Gigahertz Optik, optische Strahlungsmessgrößen). Der gemessene Wert von 3,8 nA/s führt mit der spektralen Empfindlichkeit des Geräts $s(\lambda)_\Phi = 1,4184 \cdot 10^{-4} \text{ A}_{(W,364\text{nm})}$ zu einer

applizierten Laserenergie bezogen auf die bestrahlte Fläche und die Bestrahlungslänge von 253 J/cm^2 .

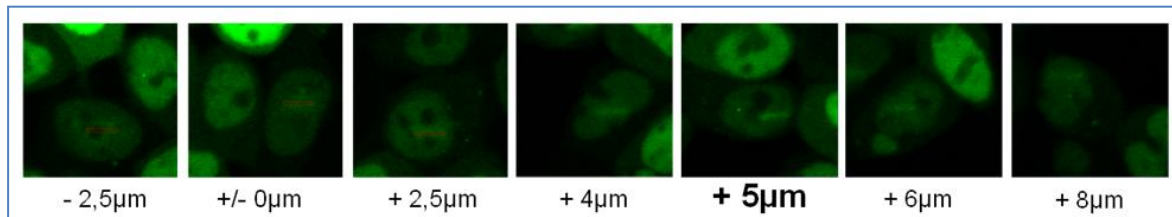


Abb.2.2 Einstellung übereinstimmender Fokalebenen von sichtbaren und ultravioletten Laserlinien mittels UVA-induziertem DNA-Schaden. In Folge von UVA-Bestrahlung akkumulieren fluoreszenzfusionierte DNA-Reparaturproteine am Ort des Schadens. Die Ebene der UVA-Bestrahlung wird entlang der z-Ebene in $0,5 \mu\text{m}$ -Schritten variiert. Die Akkumulation des Fluoreszenzproteins ist in der Ebene am deutlichsten zu erkennen, in der die Fokalebenen übereinstimmen (hier: $+ 5 \mu\text{m}$).

2.7 Einzelzell-Gelelektrophorese (*single cell gelelektrophoresis*, SCE, Comet Assay)

DNA-Schäden in Zellen können durch Einzelzell-Gelelektrophorese detektiert werden. Zuerst beschrieben von Ostling und Johanson 1984 und wesentlich verbessert von Singh et al. 1988, werden dazu einzelne, ganze Zellen in einer Agarosegelelektrophorese eingesetzt, wobei geschädigte DNA als Vielzahl von Fragmenten aus der Zelle in Richtung Anode durch die Agarosematrix diffundiert. Es kommt zum optischen Eindruck eines Kometen. In der vorliegenden Arbeit wird die Alkali-SCE eingesetzt. Dazu werden vorbereitend Objektträger (Menzel) mit 1,5 % Agarose beschichtet und 16 Stunden bei RT getrocknet. $2 \cdot 10^4$ Zellen werden in PBS gewaschen, in $100 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und mit $100 \mu\text{l}$ 1 % *low melting point*-Agarose/BSA (Agarose mit einer Schmelztemperatur von 37°C) versetzt. $50 \mu\text{l}$ werden als Tropfen auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht. Nach dem Erstarren der Agarose bei 4°C werden die Objektträger mit Lysispuffer überschichtet und für 30 min bei 4°C inkubiert, um die Zellmembranen zu zerstören. Anschließend erfolgt zur Trennung der DNA-Doppelstränge eine Inkubation für 20 min bei 4°C in Alkalipuffer. Auf diese Weise führen auch SSBs zur Fragmentierung der DNA, welche in der Elektrophorese durch das Feld diffundiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 4°C . Die Objektträger werden gleichmäßig in einer Elektrophoresekammer appliziert (Horizon 11×14) und knapp mit Alkalilösung überschichtet. Nach Anlegen von 25 V Spannung wird so lange Alkalilösung hinzugegeben oder abgenommen, bis 300 mA Stromstärke erreicht wird. Diese wird über die Elektrophorese von 40 min konstant gehalten. Anschließend werden die Objektträger zweimal für 5 min in Wasser (bidest.) gewaschen und anschließend 5 min in 70 % Ethanol inkubiert. Nach dem

Eintrocknen der Agarose bei RT werden 50 µl der SYBR Green I-Lösung auf jeden Agarose-Tropfen gegeben und 5 min im Dunkeln inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgt nach dem Abnehmen der Färbelösung und dem Trocknen der Träger.

Lysispuffer: 2,5 M NaCl
 100 mM EDTA
 10 mM Tris pH 10
 1 % v/v TritonX100

Alkalilösung: 1 mM EDTA
 300 mM NaOH

SYBR Green I-Lösung: 1:10.000 in TE

3. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse werden in drei Bereiche unterteilt. Zuerst wird die Expression von MMR-Proteinen, für die primär Funktionen in der Meiose nachgewiesen sind, in humanen Tumorzelllinien analysiert. Eine Expressionsanalyse der Gene MSH4, MSH5 und MLH3 in diesen Linien bietet daher einen Ansatzpunkt zur Untersuchung möglicher redundanter Funktionen zwischen den Proteinen der MMR-Familie.

Im zweiten Abschnitt erfolgt eine nähere Untersuchung der Gene MSH4, MSH5, MLH3 sowie MLH1, PMS2 und PMS1 mithilfe Techniken reverser Genetik. Hier wird die Herstellung von cDNA verschiedener Gene, die Klonierung in ein multicistronisches Vektorsystem sowie die Transfektion von humanen Zelllinien beschrieben. Die Expression von Genen in Fusion mit Fluoreszenzproteinen ermöglicht dabei neben der Visualisierung des Zielproteins *in vivo* auch biochemische Analysemethoden.

Zuletzt wird die Beteiligung ausgewählter MMR-Proteine an der Antwort auf DNA-Schäden untersucht. Die Induktion von DNA-Läsionen mithilfe eines UV-Lasers und eines alkylierenden Chemotherapeutikums ermöglicht dabei Aussagen über Reparaturprozesse in den Zellen.

3.1 Analyse der Proteine MSH4, MSH5 und MLH3 in humanen Zelllinien

Im folgenden Teil der Arbeit sollen die Genprodukte von MSH4, MSH5 und MLH3 in humanen Zelllinien detektiert werden. Grundlage der Analyse sind in Internetdatenbanken hinterlegte Informationen über Gen, Ort und Proteingröße von MSH4, MSH5 und MLH3. Die Sequenzen und chromosomalen Lokalisationen wurden anhand der NCBI Nucleotide (Genbank)-Einträge und Proteingrößen anhand UniProtKB ermittelt. Die Proteingröße beträgt für MSH4 104,756 kDa, für MSH5 92,875 kDa und für MLH3 163,712 kDa (Tab.3.1).

Tab.3.1 Grundlegende Informationen über die zu untersuchenden Gene. Referenz-Sequenzen bezeichnen Genbank-Einträge, die Lokalisation im Genom wurde über NCBI ermittelt. Die errechneten Proteingrößen beruhen auf Informationen der Datenbank UniProtKB.

	Referenz-Sequenz	Lokalisation im Genom	Größe (bp)	Proteingröße (kDa)
MSH4	NM_002440	1p31	2808	104,756
MSH5	NM_025259	6p21.3	2502	92,875
MLH3	NM_001040108	14q24.3	4359	163,712

Vorbedingungen der Analyse der Proteinexpression

Mit den zur Verfügung stehenden Methoden soll die Proteinexpression über Antikörpernachweis erfolgen. Die Detektion mittels Western Blot bietet dabei Aufschluss über die Proteingröße, während die Immunofluoreszenz-Technik einen visuellen Nachweis des Zielproteins in Zellen liefern kann.

In Western Blot-Vorexperimenten dieser Arbeit wurden mehrere Antikörper gegen MSH4, MSH5 und MLH3 der Hersteller Abcam (Cambridge, USA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA), Bethyl (Montgomery, USA) und Acris (Herford, Deutschland) eingesetzt. Spezifische Zelllinien, für die An- bzw. Abwesenheit der entsprechenden Proteine bekannt ist, wurden als Kontrollen eingesetzt. Trotz wiederholter Änderung verschiedener Bedingungen führten die Antikörper zu keiner spezifischen Detektion. Andere Arbeitsgruppen berichten ebenfalls, dass kein kommerziell erhältlicher Antikörper erfolgreich zur Detektion von endogenem MSH4, MSH5 oder MLH3 eingesetzt werden konnte (Santucci-Darmanin et al. 2000, 2002; Cannavo et al. 2005).

Die Entwicklung von Antikörpern für die Forschung wird seitens der Hersteller meist lediglich durch Western Blot gegen das immunisierende Agens (Peptid) kontrolliert. Erfolgt kein geeigneter Nachweis an biologischem Material, kann diese unzureichende Evaluation zum Verkauf von funktionslosen Produkten führen. Diese strikt absatzorientierte Politik der Antikörperhersteller führt zu erheblichem Arbeits- und Zeitaufwand in den entsprechenden Forschungsprojekten. Der Mangel an kommerziell verfügbaren Antikörpern, die endogenes MSH4, MSH5 und MLH3 detektieren, ist bis heute nicht behoben. Trotz intensiver Bemühungen konnte daher keine Analyse der endogenen Proteinexpression durchgeführt werden.

3.2 Analyse der Transkripte von MSH4, MSH5 und MLH3 in humanen Zelllinien

Der Umstand fehlender Antikörper beschränkte die Untersuchung der Zelllinien auf eine Transkriptanalyse, welche mittels Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt wurde. Um falsch-positive Signale in der RT-PCR auszuschließen, wurden Kontrollen und Primer wie folgt ausgewählt.

Ausschluss falsch-positiver Signale

Die Herstellung von mRNA aus Zellen zu testender Zelllinien sowie aus Primärzellen eines gesunden Spenders erfolgte mittels TRIZOL-Aufreinigung (2.4.2). Bei dieser Methode ist die Möglichkeit der unbeabsichtigten Isolierung genomischer DNA (gDNA) nicht

auszuschließen. Exonspezifische Primer für das ABL Gen wurden im Vorfeld der Analyse zur Überprüfung der cDNA-Qualität verwendet. Dabei kann eine Amplifikation von cDNA und gDNA über die Amplicongröße unterschieden werden (2.4.5). Um darüberhinaus falsch-positive Signale durch Verunreinigung mit kleinsten Mengen an gDNA konsequent auszuschließen, wurden die Primer für die zu untersuchenden Gene so entworfen, dass jedes Paar mindestens ein Intron der Gensequenz überspannt. Dennoch können Pseudogene zu falschen Ergebnissen der RT-PCR führen. Laut Internet-Datenbanken (ENSEMBL, genecards) sind jedoch für MSH4, MSH5 und MLH3 keine derartigen paralogenen Gene bekannt. Weiterhin wurde aufgrund der Limitierung der Amplifikationslänge des Enzyms Reverse Transkriptase darauf geachtet, vorwärts- und rückwärts gerichtete Primer der RT-PCR nicht in größerem Abstand als 1500bp voneinander entfernt zu positionieren.

Genstruktur von MSH4, MSH5 und MLH3

Die Herstellung geeigneter Primerpaare erfolgte unter den genannten Vorbedingungen anhand der Genstrukturen. Abb.3.1 zeigt die Exonstruktur der Gene. Das Gen MLH3 weist ungewöhnlich unterschiedliche Exongrößen auf. Der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) der Größe 4359 bp erstreckt sich über 13 Exons, wobei der größte Teil (3280 bp) auf dem zweiten Exon ohne Unterbrechung eines Introns codiert wird. Aufgrund dieser strukturellen Besonderheiten konnten lediglich drei Primerpaare entworfen werden, die gemäß Vorbedingungen zur Transkriptanalyse geeignet sind (Abb.3.1). Für die kürzeren Gene MSH4 (2808 bp) und MSH5 (2502 bp) wurde jeweils ein intronüberspannendes Primerpaar zur Amplifikation der Gene entworfen, welches in der Expressionsanalyse eingesetzt wurde (Abb.3.1).

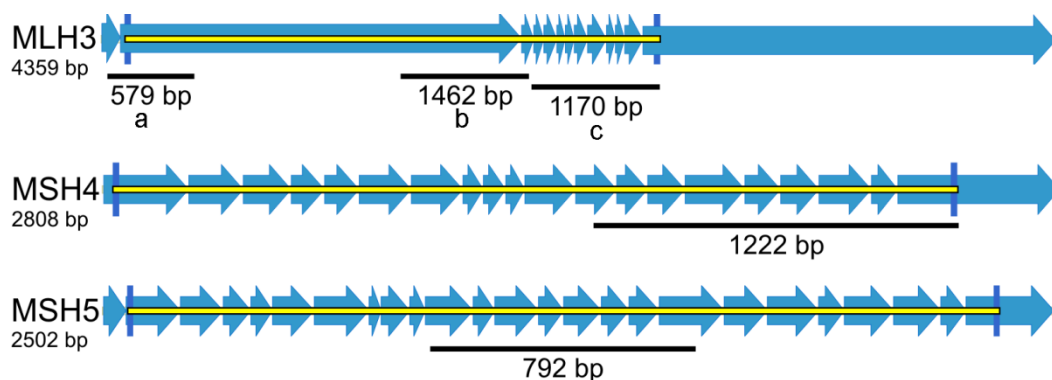


Abb.3.1 Darstellung der Exonstruktur der Gene MLH3, MSH4 und MSH5 anhand der Referenzsequenzen (2.1.1). Exons sind blau, offene Leserahmen als gelbe Linien dargestellt. Die Exons eines Gens sind zueinander maßstabsgetreu abgebildet. In der Transkriptanalyse untersuchte Amplicons sind als schwarze Linien dargestellt. Dabei werden die Amplicons von MLH3 in a, b und c unterschieden.

Zelllinien

Aus zuvor an der DSMZ durchgeführten Analysen sind eine Reihe humaner Tumorzelllinien bekannt, die MSI aufweisen (Dirks et al. 2004, Tagungsbeitrag). In weiterführenden Arbeiten konnte durch eine Expressionsanalyse der MSI-Status in den meisten Fällen auf Abwesenheit einzelner MMR-Proteine zurückgeführt werden (Dissertation A. Siebert 2007). Weiterhin wurden Kontrollzelllinien mit MSS-Status analysiert.

Jeweils gleiche Mengen isolierter RNA der zu untersuchenden Linien wurde in cDNA umgeschrieben und als Template für die spezifischen PCRs eingesetzt. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden für die einzelnen Genprodukte Wasser, genomische DNA und, soweit vorhanden, Plasmid-DNA verwendet.

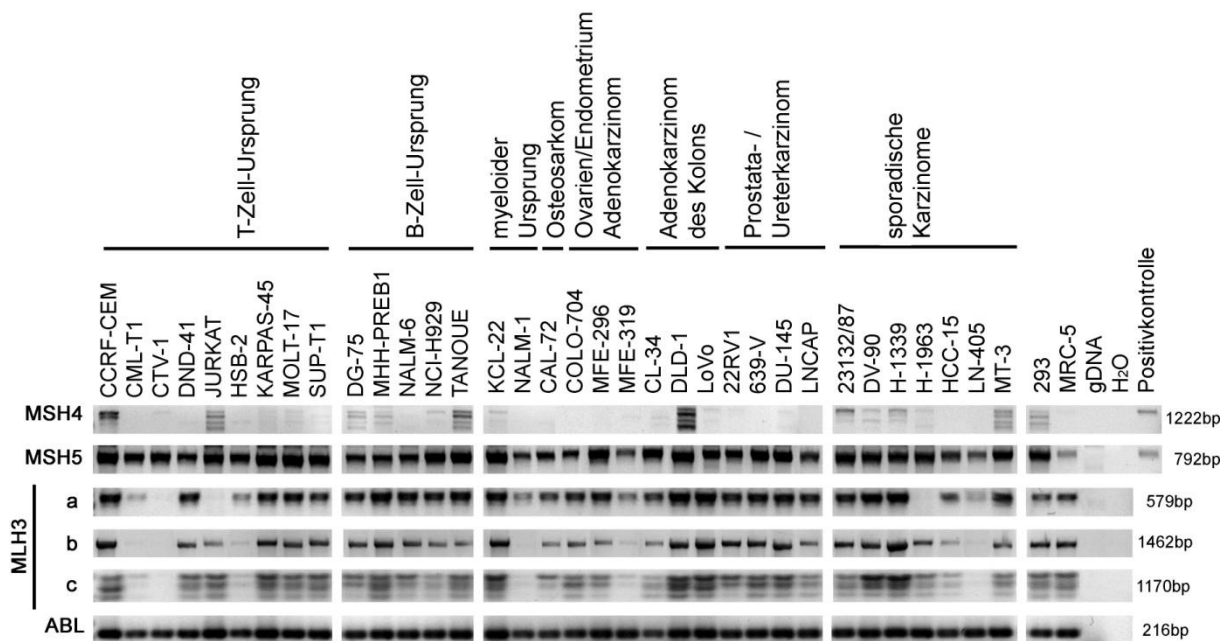


Abb.3.2 Transkriptanalyse von Tumorzelllinien mit MSI-Status. Elektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte im Agarosegel führte zur spezifischen Detektion von Amplicons der Gene MSH4, MSH5 und MLH3. Zur Kontrolle der Reaktion wurden cDNAs eines gesunden Spenders (MRC-5) und der MSS-Zelllinie 293, darüberhinaus für MSH4 und MSH5 Plasmid-DNA eingesetzt. gDNA führte in keiner Reaktion zu entsprechenden Amplicons. Die einheitliche Qualität eingesetzter cDNAs ist über die gleichmäßige Amplifikation von ABL zu erkennen. Untersuchte Zelllinien sind nach Ursprungsgewebe sortiert dargestellt. Für die Zelllinien CCRF-CEM, DND-41, NCI-H929, KCL-22, 639-V und DU-145 ist der MSI-Status auf fehlende MLH1-Expression zurückzuführen (Promotion A. Siebert 2007).

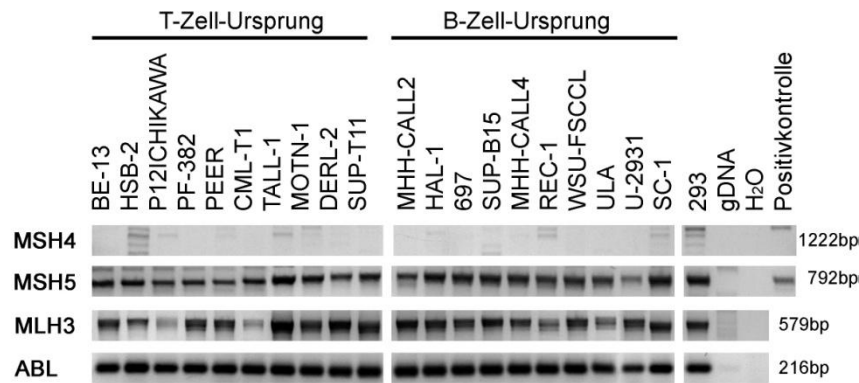


Abb.3.3 Transkriptanalyse von Tumorzelllinien mit MSS-Status. Wie in Abb.3.2 sind RT-PCR-Produkte nach Gelelektrophorese dargestellt. Zur Amplifikation von MLH3 wurde das Primerpaar a eingesetzt. Zur Kontrolle der Reaktion für MSH4 und MSH5 wurde Plasmid-DNA eingesetzt. Wasser und gDNA wurden wie zuvor als Negativkontrollen mitgeführt. Amplifikation von ABL diente wiederum der Kontrolle der cDNA-Qualität.

3.1.1 Transkriptanalyse MSH4 / MSH5

In der Transkriptanalyse des Gens MSH4 konnte durch Amplifikation von cDNAs der vorliegenden Zelllinien sporadisch eine Transkription des Gens MSH4 nachgewiesen werden. In 7/34 Zelllinien mit MSI-Status sowie 2/20 MSS-Linien war ein schwaches spezifisches Signal erkennbar (Abb.3.2; Abb.3.3). Das Amplicon der erwarteten Größe (1222 bp) konnte in einzelnen Zelllinien verschiedener Ursprungsgewebe detektiert werden, darunter in Zelllinien mit T- und B-Zell-Ursprung und solchen, die aus Kolon-, Brust- und Magenkarzinomen etabliert wurden. In diesen Proben war wiederkehrend ein Motiv von vier Signalen geringerer Größe im Abstand von ca. 100 bp erkennbar. Da mehrere Exons der Größe 89-119 bp durch dieses Primerpaar überspannt werden liegt nahe, dass das beobachtete Bandenmuster auf alternatives Spleißen zurückzuführen ist. Zur Kontrolle der PCR-Reaktion wurde Plasmid-DNA eingesetzt, welche die komplette cDNA-Sequenz von MSH4 enthält (zur Verfügung gestellt von R. Kolodner, University of California, La Jolla, USA). Transkriptionsprodukte treten gleichermaßen sporadisch in Geweben unterschiedlichen Ursprungs sowie in Unabhängigkeit zum MSI-Status auf. Die schwach zu detektierenden Banden sind das Resultat geringer Mengen an RNA und gelten im Allgemeinen als Hinweis darauf, dass in Folge kein Protein gemessen werden kann.

Transkriptanalyse hinsichtlich des Gens MSH5 führte dagegen zu deutlichen Amplicons der erwarteten Größe von 792 bp. Das Signal wurde ubiquitär in allen getesteten Linien und in Höhe der Plasmid-Positivkontrolle (zur Verfügung gestellt von R. Kolodner) detektiert. Während im Gegensatz zu MSH4 keine weiteren relevanten Banden auftreten, weist die

Expressionshöhe auf die Translation von MSH5 in humanen Tumorzellen hin. Dabei sind keine Unterschiede zwischen Zelllinien des MSI- und MSS-Status erkennbar.

3.1.2 Transkriptanalyse MLH3

Die RT-PCR von MLH3 führte für jedes der drei Primerpaare zu Signalen in der erwarteten Größe. Primerpaar c, welches 12 Exons überspannt, erzeugte ein wiederkehrendes Muster an Banden, wobei das größte Fragment der erwarteten Größe von 1170 bp entsprach. In Abb.3.2 (MLH3c) wird dies durch intensive Trennung der Banden mittels Gelelektrophorese besonders deutlich. Der Abstand der Banden beträgt jeweils ca. 50-100 bp. Wie für MSH4 berichtet, legen vorhandene Exons entsprechender Größe nahe, dass das Bandenmuster alternativ gespleißte mRNA widerspiegelt. Berichte über alternatives Spleißen innerhalb dieses Bereiches von MLH3 unterstützen diese Vermutung (Lipkin et al. 2000). Während auf diese Weise für die Mehrheit der untersuchten Zelllinien Transkription des Gens MLH3 nachgewiesen wurde, konnte bei 7/34 (21 %) Zelllinien mit MSI-Status kein vollständiges MLH3-Transkript amplifiziert werden. Diese Abwesenheit von MLH3-Transkripten wurde in Tumorzelllinien gefunden, die aus Leukämien, Endometrium-Adenokarzinomen, kleinzelligen Lungenkarzinomen und Astrozytomen etabliert wurden. Interessanterweise konnte in allen untersuchten MSI-Zelllinien mit bekannter MLH1-Defizienz Signal für MLH3-Transkript in vollem Umfang nachgewiesen werden. Entgegen dieser Beobachtungen war in 20/20 getesteten Zelllinien mit MSS-Status MLH3-mRNA nachweisbar. Eine Translation in humanen Tumorzelllinien wird daher erwartet, kann jedoch nicht überprüft werden.

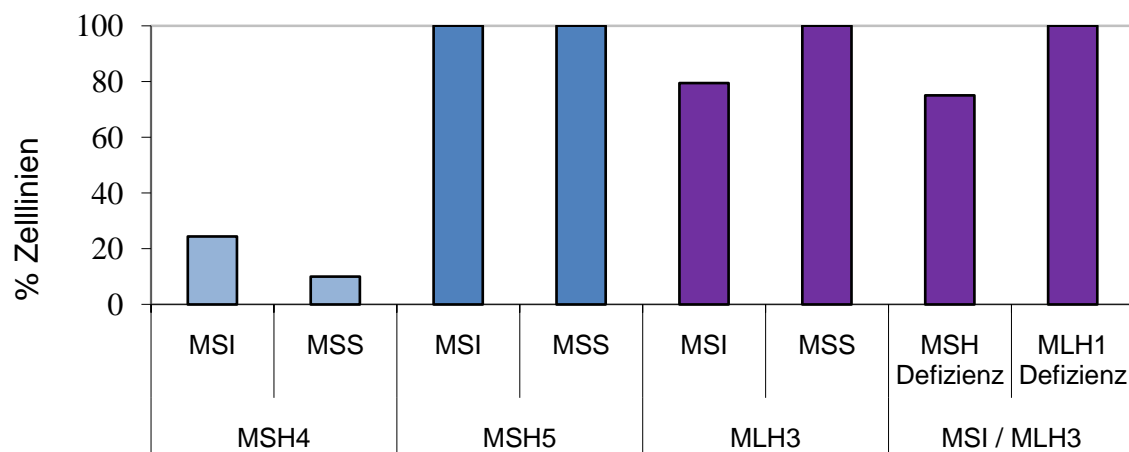


Abb.3.4 Zusammenfassende Darstellung der Transkriptanalyse. Säulen repräsentieren die relative Anzahl untersuchter Tumorzelllinien, in denen Transkript der Gene MSH4, MSH5 bzw. MLH3 nachgewiesen werden konnte. Dabei wird in dieser Darstellung zwischen Zelllinien mit MSI- und MSS-Status unterschieden. Hinsichtlich der Transkription von MLH3 wird zusätzlich zwischen MSI-Linien unterschieden, für die MLH1-Defizienz bekannt ist (CCRF-CEM, DND-41, NCI-H929, KCL-22, DU-145, 639-V), sowie Zelllinien, bei denen die MSI auf Mutationen der Proteine MSH2, 3 und 6 zurückzuführen ist.

Zusammenfassung der Transkriptanalyse

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse sind in Abb.3.4 grafisch dargestellt. Es ist erkennbar, dass die sporadische und darüber hinaus schwache Expression gegen eine Rolle von MSH4 in MMR humaner Tumorzelllinien argumentiert. Da MSH5-Transkripte in allen untersuchten Zelllinien deutlich nachgewiesen werden konnten, ist eine Funktion in somatischen Zellen im Gegensatz zu MSH4 nicht auszuschließen. Ohne die Analyse der Proteinexpression kann jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden. Allerdings wird deutlich, dass das Heterodimer MutS γ aufgrund der Abwesenheit von MSH4 in den untersuchten somatischen Zelllinien nicht vorliegt und eine potentielle Funktion von MSH5 nicht auf der Dimerisierung mit MSH4 basiert. MLH3-mRNA ist in MSI-Zelllinien teilweise nicht oder nur schwach detektierbar. Abwesenheit von MLH3-Transkripten tritt jedoch in keiner untersuchten Zelllinie auf, für die eine MLH1-Defizienz bekannt ist.

Die Transkriptanalyse liefert daher für MLH3 einen Hinweis auf Redundanz zwischen den α/β - und γ -Heterodimeren. Im Folgenden wird daraufhin untersucht, ob und inwiefern MLH3 eine Funktion in humaner MMR trägt und dies ein redundantes System zum Schlüsselkomplex MutL α darstellt.

3.2 Expression rekombinanter cDNAs

Zur näheren Untersuchung dieser und weiterer Gene erfolgten die Klonierung der cDNA und die anschließende Transfektion von humanen Zelllinien. Durch die rekombinante Expression wird auch die Nicht-Verfügbarkeit passender Antikörper für die Proteine der MMR γ -Heterodime umgangen, da gegen die in Fusion exprimierten Fluoreszenzproteine gerichtete Antikörper zum immunologischen Nachweis verwendet werden können.

Quelle der cDNA

PCR-Produkte der Gene MLH1, PMS2, PMS1 und MLH3 wurden von der cDNA eines gesunden Spenders (primäre, nicht immortalisierte Zelllinie MRC-5, Jacobs et al. 1970) amplifiziert und in ein multicistronisches Vektorsystem ligiert. Primer, die das 5'- und 3'-Ende der Sequenz binden, enthielten zusätzlich zur Gensequenz weitere Basen, codierend für bestimmte Restriktionsschnittstellen, die als Linker für die Klonierung in bestehende Expressionsvektoren dienten (siehe 2.2.3). Da für jedes Gen dieselben Restriktionsschnittstellen an die Sequenz angehängt wurden, konnten die cDNAs in einem standardisierten System in verschiedene Vektoren ligiert werden. Zur Expression der Gene MSH4 und MSH5 wurde wie beschrieben auf zur Verfügung gestelltes Material zurückgegriffen (3.1.1).

Varianten der Gene

Bei der Amplifikation von MLH3 traten neben WT-Gensequenzen auch Varianten des Gens auf, die vermutlich auf alternatives Spleißen zurückzuführen sind. Diese Transkriptsequenzen zeichnen sich durch die Abwesenheit einzelner Exons aus, wobei der Leserahmen intakt bleibt. Eine Übersicht von wiederholt gefundenen alternativen Transkripten ist in Abb.3.5 (V1-3) dargestellt. In Variante 1 wurde Exon7 herausgespleißt. Diese Isoform wurde bereits 2000 durch Lipkin et al. als „MLH3 Δ 7“ beschrieben und zeichnet sich durch die Abwesenheit des zentralen Endonuklease-Motivs (s. 1.3.6) aus. In den Varianten 2 und 3 ist neben Exon7 jeweils ein weiteres Exon nicht vorhanden (Exon4 bzw. Exon8).

Um potentielle MMR-Funktionen des Proteins MLH3 genau untersuchen zu können, wurden darüberhinaus im Vorfeld der Analysen Deletionsmutanten des Gens hergestellt (2.2.8). Diese weisen Deletionen in Bereichen der Gensequenz auf, für die eine bestimmte Funktion gezeigt oder vorausgesagt wurde. Neben der Endonuklease-Domäne weist das MLH3-Gen weitere konservierte Motive auf. Charakteristisch für alle MutL-homologen Proteine ist die N-terminal lokalisierte ATPase-Domäne (Dutta und Inouye 2001). Dagegen wird über den C-

Terminus des Proteins ein Großteil der Bindung an MLH1 vermittelt (Kondo et al. 2001). Die Herstellung von N- und C-terminal verkürzten Gensequenzen (Abb.3.5, del.N und del.C) erfolgte über die Einführung alternativer Start- und Stopp-Codons in die cDNA von MLH3 (s. 2.2.8). Weiterhin wurde eine MLH3-cDNA mit einer Mutation innerhalb der ATPase-Domäne kloniert (Abb.3.5, mutATP). Durch Einführung einer Punktmutation mithilfe eines Primers, der einen Basenaustausch an der entsprechenden Stelle trägt, wurde die zentrale Aminosäure der ATP-Bindung mutiert (A84C bzw. Glu28Ala; s. 2.2.8). Durch mehrere Studien wurde eine Reduzierung der Aktivität von ATPasen der GHKL-Familie (Gyrase, Hsp90, Histidinkinase, MutL-ATPase) um 90-100 % durch diese Veränderung belegt (Ban et al. 1999; Guané et al. 2001; Johnson et al. 2010). Die Expression derartiger Deletionsmutanten ermöglicht im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein Struktur-Funktions-Analysen (3.3.2).

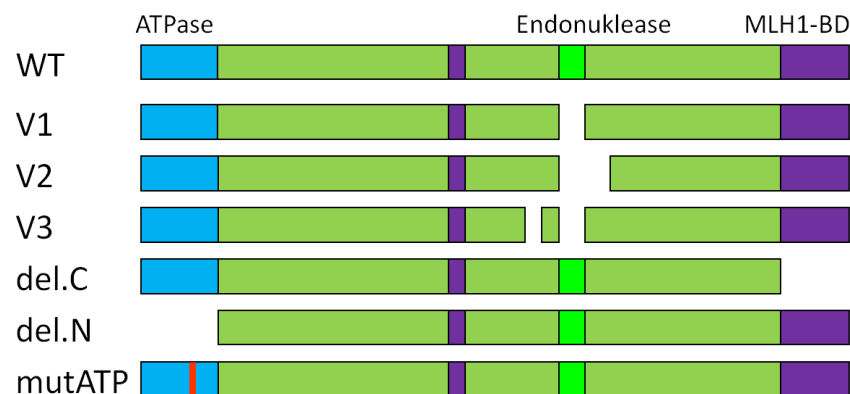


Abb.3.5 Varianten und Deletionsmutanten des Proteins MLH3. Die Konstrukte V1, V2 und V3 gehen auf die Amplifikation von cDNA aus MRC-5 zurück und sind vermutlich Produkte alternativen Spleißens. Version V1 enthält kein Exon7, in Version V2 fehlen die Exons7 und 8, in V3 die Exons4 und 7. Die Deletionsmutanten del.C und del.N wurden durch Restriktionsverdau der WT-cDNA erstellt. Infolgedessen fehlt del.C die primäre Bindestelle für MLH1 und del.N die hochkonservierte ATPase-Domäne. Ebenso sollte die ATPase-Aktivität von MLH3 über das Einfügen der Punktmutation A83C (Glu28Ala) im Konstrukt mutATP inhibiert werden.

Expressionsvektoren

Zur Expression rekombinanter Gene wurden diese in Fusion mit Sequenzen von Fluoreszenzgenen in Expressionsvektoren ligiert. Die Fusion erfolgte N-terminal, da Proteine der MMR-Familie nach C-terminaler Fusion oft Funktionsausfälle zeigen (persönliche Mitteilung W. Dirks). Hierfür wurde ein Derivat des bicistronischen Expressionssystems SBC-1 und SBC-2 (Dirks et al. 1993) verwendet. Bicistronische Vektoren zeichnen sich dadurch aus, dass die für zwei verschiedene Proteine codierenden Sequenzen unter der Kontrolle eines einzigen Promotors stehen. In Folge dessen entsteht eine einzelne mRNA, die für beide Proteine codiert. Hierbei wird die Translation des vom ersten Cistron codierten

Proteins über die Cap-Struktur und die des vom zweiten Cistron codierten Proteins über eine *internal ribosomal entry site* (IRES) vermittelt (Abb.3.6). Die auf dem Transkript codierten Proteine werden stets in einem konstanten Verhältnis zueinander exprimiert, wobei das vom ersten Cistron codierte Protein stets dominant exprimiert wird (Dirks et al. 1993). Während die für das Zielgen codierende cDNA an Stelle des ersten Cistrons kloniert wurde, codiert, wie in Abb.3.6 dargestellt, das zweite Cistron der in dieser Arbeit verwendeten bicistronischen Vektoren für das selektive Markergen Puromycin N-Acetyltransferase (PAC). Durch die Expression von Zielgen und selektivem Markergen auf einem Transkript wird die Expression des gewünschten Gens unter Selektionsdruck weitgehend sichergestellt. Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurden in tricistronischen Expressionsvektoren neben dem Resistenzgen cDNAs codierend für zwei Fusionsproteine, verbunden über ein weiteres IRES-Element, kloniert (Abb.3.6). Hierbei wurden Fluoreszenzproteine verwendet, die sich im Wellenlängenbereich der Emission deutlich unterscheiden.

Auf diese Weise wurden Gene des MMR-Systems kloniert, die in Zellen die Komplexe MutL α , MutL β , MutL γ und MutS γ bilden. Weiterhin wurden auch einzelne Proteine der MMR-Familie mit PCNA co-exprimiert. Insgesamt wurden 19 Expressionsvektoren kloniert, die zur stabilen Expression in humanen Zellen eingesetzt wurden (Tab.3.2).

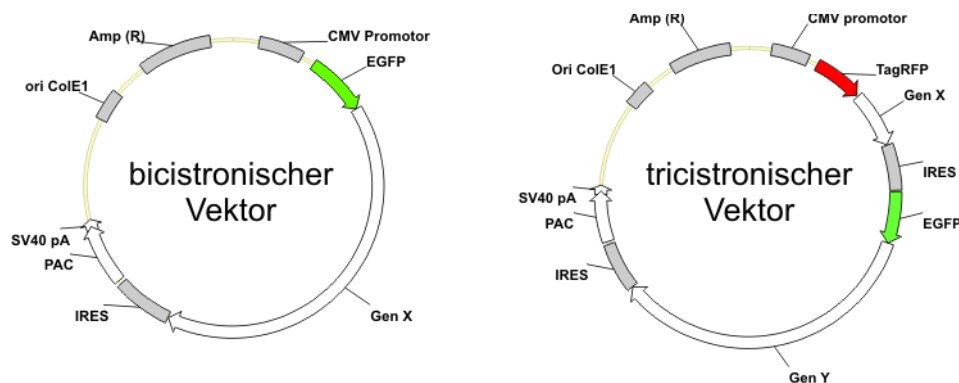


Abb.3.6 Verwendete multicistronische Expressionsvektoren. Links: Die Transkriptionskassette steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Promotor des humanen Cytomegalie-Virus) und beinhaltet cDNA-Sequenzen eines Fluoreszenzmarkergens (hier: *enhanced green fluorescent protein*, EGFP), des zu untersuchenden Gens, eines IRES-Elements, des selektiven Markergens (PAC) und eines Polyadenylierungssignals aus SV40 (Simian-Virus 40). Weiterhin enthält der Vektor einen Replikationsursprung und ein Ampicillinresistenzgen zur Amplifikation des Plasmids in *E.coli*. Rechts: Im tricistronischen Konstrukt wurde eine weitere Sequenzeinheit eingefügt. Diese besteht aus cDNA eines Fluoreszenzmarkergens (hier: TagRFP, Evrogen, Russland) in Fusion mit cDNA eines zweiten zu untersuchenden Gens und einem weiteren IRES-Element. Alternativ wurden die Fluoreszenzproteine mCherry, YFP und CFP eingesetzt.

Tab.3.2 Übersicht der Vektorkonstrukte zur stabilen Expression in humanen Zellen. Den verschiedenen Vektoren werden in dieser Auflistung die klonierten cDNAs der einzelnen Cistrons zugeordnet. Weiterhin werden Untersuchungen der vorliegenden Arbeit aufgeführt, in denen entsprechende rekombinante Zellen eingesetzt wurden.

Vektorname	1.Cistron	2.Cistron	3.Cistron	Verwendung
pMC-G-MLH1-P	GFP-MLH1	PAC		<div> Lokalisation, Bindeverhalten </div>
pMC-G-PMS2-P	GFP-PMS2	PAC		
pMC-G-PMS1-P	GFP-PMS1	PAC		
pMC-Y-MSH4-P	YFP-MSH4	PAC		
pMC-C-MSH5-P	CFP-MSH5	PAC		
pMC-G-MLH3-P	GFP-MLH3-WT	PAC		
pMC-G-MLH3-V1-P	GFP-MLH3-V1	PAC		<div> DDR, Struktur-Funktions-Analyse </div>
pMC-G-MLH3-V2-P	GFP-MLH3-V2	PAC		
pMC-G-MLH3-V3-P	GFP-MLH3-V3	PAC		
pMC-G-MLH3-del.C-P	G-MLH3-del.C	PAC		
pMC-G-MLH3-del.N-P	G-MLH3-del.N	PAC		
pMC-G-MLH3-mutATP-P	G-MLH3-mutATP	PAC		
pMC-G-His-MLH3-P	G-His-MLH3-WT	PAC		Affinitätschromatographie
pMC-TR-MLH1-G-PMS2-P	mCherry-MLH1	GFP-PMS2	PAC	<div> DDR DDR DDR, Co-IP </div>
pMC-TR-MLH1-G-PMS1-P	mCherry-MLH1	GFP-PMS1	PAC	
pMC-TR-MLH1-G-MLH3-P	TagRFP-MLH1	GFP-MLH3-WT	PAC	
pMC-Y-MSH4-C-MSH5-P	YFP-MSH4	CFP-MSH5	PAC	
pMC-TR-PCNA-G-MLH3-P	TagRFP-MLH1	GFP-MLH3-WT	PAC	FRAP, Zellzyklus, DDR
pMC-TR-MLH3-G-MLH3-P	TagRFP-MLH3-WT	GFP-MLH3-WT	PAC	Co-IP

Auswahl humaner Zelllinien zur Expression

Die embryonale Nierenzelllinie 293 (auch bekannt als HEK293, *human embryonal kidney 293*) ist für eine hohe Transfektionseffizienz bekannt. Aufgrund Funktionalität aller MMR-Proteine zeigt diese Zelllinie MSS-Status. Durch Insertion des Gens für eine SV40 T-Antigen-Mutante wurde ein Derivat dieser Linie etabliert (DuBridge et al. 1987), welches unter dem Namen 293T ebenfalls als weit verbreitete Zelllinie bekannt ist. Neben einer hohen Proliferationsrate zeichnet diese sich durch weiter erhöhte Transfektionseffizienz aus. Die isogenen Linien 293 und 293T unterscheiden sich darüberhinaus in einer Hypermethylierung der Promotoren für MLH1 und MLH3 in 293T (Trojan et al. 2002; Cannavo et al. 2005), was

zu einem epigenetischen silencing beider Gene führt und den Status MSI hervorruft. Darüberhinaus sind die Proteine PMS1 und PMS2 in 293T-Zellen nicht nachweisbar, da diese in menschlichen Zellen ausschließlich über direkte Bindung an MLH1 stabilisiert werden (Räschle et al. 1999; Jiricny und Marra 2003). Diese Defizienz der Linie 293T für alle bekannten Proteine der MutL-Familie bietet optimale Möglichkeiten für Rekonstitutionsexperimente: eine Expression verschiedener MutL-homologer Proteine in der Zelllinie 293T bietet ein ideales System, um im experimentellen Vergleich mit 293-Zellen eine mögliche Wiederherstellung der MMR zu untersuchen.

Weiterhin wurde die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT-1080 zur rekombinanten Expression verwendet, da sich in dieser Linie zelluläre Substrukturen wie Nucleus, Cytoplasma und Nucleoli in der mikroskopischen Betrachtung deutlicher voneinander abheben. Wie für 293 beschrieben weist auch HT-1080 MMR-Profizienz und MSS auf.

Transfektion humaner Zelllinien

Eine stabile Expression in humanen Zellen ermöglicht im Vergleich zu transienter Genexpression hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Verwendung stabil transfizierter Einzelklone stellt darüberhinaus sicher, dass alle Zellen der Population bezüglich Kopienzahl und Insertionsort identisch sind. Durch diesen einheitlichen genetischen Status wird eine Vergleichbarkeit von Zellen innerhalb einer Population ermöglicht. Die Etablierung von Einzelklonen stellt jedoch einen Prozess des selektiven Auswachsens von Seitenlinien dar. Daher müssen Beobachtungen stets durch Wiederholungen mittels weiterer Einzelklone verifiziert werden.

Zur stabilen Integration der bi- und tricistronischen Vektoren in das Genom humaner Zelllinien wurden zwei Wochen nach der Transfektion unter Selektionsdruck proliferierende Zellen in Form von 12 unabhängigen Einzelklonen isoliert und in Mikrotiterplatten kultiviert. Da eine hohe Fluoreszenzintensität für die Detektion experimentell von Vorteil ist, wurde durch Fluoreszenzmikroskopie eine weitere Selektion hinsichtlich der Expressionshöhe durchgeführt. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte im Anschluss für jeden Einzelklon mittels Western Blot gegen das Fluoreszenzprotein. Um Ergebnisse unabhängig reproduzieren zu können, wurden je Expressionskonstrukt mindestens zwei stabil exprimierende Einzelklone der parentalen Zelllinien 293, 293T und HT-1080 etabliert.

Die errechnete Transfektionseffizienz der in Tab.3.2 aufgelisteten Vektoren lag deutlich unterhalb der in vorangegangenen Experimenten für Kontroll-Konstrukte gemessenen Werte. Wie aus der Literatur und vorangegangenen Arbeiten bekannt, ist eine Überexpression von

MMR-Proteinen in Zellen letal (Dissertation A. Siebert 2007, s. 4.3). Diese berichtete Toxizität der MMR-Proteine ist als wesentliche Ursache mangelnder Charakterisierung von MLH3 in MMR anzusehen. Diese Arbeit zeigt die erste stabile rekombinante Expression von MLH3 und MutL γ in humanen Zellen.

3.3 Untersuchung der rekombinanten Einzelklone

Experimentelle Untersuchung der Einzelklone sollte zunächst sicherstellen, dass die rekombinanten Fusionsproteine in den etablierten Einzelklonen vergleichbare Eigenschaften zu endogenen MMR-Proteinen zeigen. Dies sollte über Protein-Protein-Interaktionen der verschiedenen MMR-Proteine überprüft werden. Weiterhin sollten die bisher schwierig zu untersuchende MMR-Proteine MSH4, MSH5 und MLH3 näher beleuchtet werden. Neben der Beschreibung der Mobilität in der Zelle sollten Untersuchungen hinsichtlich einer Beteiligung an DNA-Reparatur gemacht werden. Dazu wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die zum einen eine Beteiligung an der Antwort auf DNA-Schäden (*DNA damage response*, DDR) und zum anderen spezifisch eine Funktion in der MMR nachweisen können.

3.3.1 Liegt für die rekombinanten Proteine natürliches Bindeverhalten vor?

Die Charakterisierung von Proteinfunktionen mit Hilfe von Fusionsproteinen bringt verschiedene Risiken mit sich. Das fusionierte Markerprotein kann unter Umständen zu einer Fehlfaltung führen oder wichtige Domänen des zu untersuchenden Proteins maskieren, und damit z.B. Proteininteraktionen verhindern.

Wie einleitend beschrieben erfolgt der Import von MMR-Proteinen in den Nucleus als Heterodimer. Lokalisation der rekombinanten Proteine im Zellkern kann daher als Hinweis auf die Protein-Protein-Interaktion gesehen werden.

Bindung endogener Partner durch rekombinante Proteine

Die Expression der bicistronischen Vektoren ermöglichte fluoreszenzmikroskopische Detektion der fusionierten Fluoreszenzproteine. Abb.3.7 zeigt repräsentative rekombinante Einzelklone, die aus der Transfektion parentaler Zelllinien mit MSI- bzw. MSS-Status hervorgegangen sind.

Es sind deutliche Unterschiede in der Lokalisation von GFP-MLH1 in den unterschiedlichen Zelllinien zu erkennen. Während in MMR-defizienten 293T-Zellen die Fluoreszenz primär im Cytoplasma detektiert werden kann, führt die Expression in MMR-profizienten Zellen zur Lokalisation in den Nuclei (Abb.3.7, 1. Zeile). Dieser Effekt ist ebenfalls für GFP-PMS1 und

in abgeschwächter Form auch für GFP-PMS2 zu erkennen (Abb.3.7, 2. und 3. Zeile). Rekombinant exprimiertes GFP-MLH3 ist dagegen sowohl in der MMR-profizienten, als auch in der defizienten Zelllinie im Nucleus lokalisiert. Im Cytoplasma ist lediglich ein leichter Hintergrund fluoreszierender Proteine zu detektieren.

Fluoreszenz der Proteinpartner des MutS γ -Heterodimers, mCherry-MSH4 und GFP-MSH5, konnte dagegen exklusiv im Cytoplasma erkannt werden.

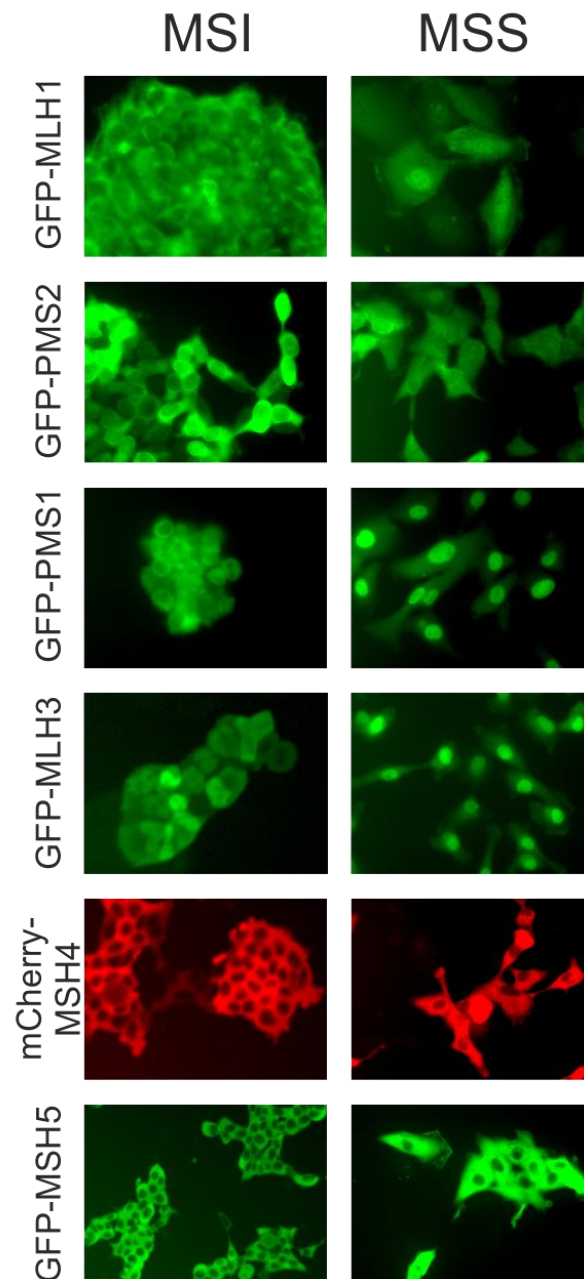


Abb.3.7 Einzelexpression rekombinanter MMR-Proteine in Fusion mit Fluoreszenzproteinen. Exemplarische Darstellung von Einzelklonen, die aus der MMR-defizienten parentalen Zelllinie 293T (MSI) bzw. MMR-profizienten parentalen Zelllinie HT-1080 (MSS) etabliert wurden. In dieser Abbildung wurden HT-1080-Einzelklone zur Darstellung der Epifluoreszenz in einer MMR-profizienten Zelllinie gewählt, da verglichen mit 293- und 293T-Zellen Nucleus und Cytoplasma deutlicher voneinander abgegrenzt sind.

Es wird deutlich, dass die Proteine MLH1, PMS2 und PMS1 nur in der MSS-Zelllinie eindeutige nukleäre Lokalisation zeigen. Es ist daher anzunehmen, dass der Import auf Bindung des endogenen Partnerproteins und der Bildung des entsprechenden Heterodimers zurückzuführen ist (s. 1.3.1). Um diese Bindung zu bestätigen, sollen nachfolgend die jeweiligen Partner in Bezug auf nukleäre Lokalisation untersucht werden.

Gegenseitige Bindung rekombinanter Proteine

Die Verwendung tricistronischer Konstrukte ermöglicht die parallele Expression von MMR-Genen, deren Produkte in der MMR als Heterodimer-Komplexe auftreten. Durch die Co-Expression zweier rekombinanter Partner soll bestätigt werden, dass eine Dimerisierung zur Lokalisation der rekombinanten Proteine im Nucleus führt. Insbesondere soll auf diese Weise Interaktion zwischen MLH3 und MLH1 (MutL γ) sowie MSH4 und MSH5 (MutS γ) überprüft werden, die im vorangegangenen Experiment nicht geklärt werden konnte.

Abb.3.8 zeigt Fluoreszenzaufnahmen von Einzelklonen der Zelllinie 293T, die mit tricistronischen Konstrukten transfiziert wurden. Auf diese Weise wurden die Partner der MMR-Heterodimere MutL α , MutL β , MutL γ und MutS γ jeweils stabil in 293T co-exprimiert. Die gemeinsame Expression der MMR-Proteine MLH1 und PMS2 führte wie erwartet zur Detektion beider Fluoreszenzen im Nucleus der Zellen. Ebenso konnte Co-Lokalisation der Fusionsproteine mCherry-MLH1 und GFP-PMS1 im Nucleus gezeigt werden und auf diese Weise die Beobachtungen bicistronischer Expression reproduzieren. Da für GFP-MLH3 auch ohne den Bindepartner MLH1 nukleäre Lokalisation erreicht wurde (Abb.3.8, 293T/GFP-MLH3), sollte untersucht werden, inwiefern Co-Expression von MLH1 und MLH3 die Lokalisation von MLH1 in der Zelle beeinflusst. Interessanterweise trat die Fluoreszenz von TagRFP-MLH1 in Folge der rekombinanten Expression des Partners MLH3 im Nucleus auf und zeigt so die Bildung rekombinanter MutL γ -Komplexe. Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung der zellulären Lokalisation für die Proteine des MutS γ -Heterodimers gezeigt werden. Vergleichbar mit vorangegangenen Beobachtungen resultierte auch die Co-Expression von CFP-MSH5 und YFP-MSH4 ausschließlich in cytoplasmatischer Lokalisation von Fluoreszenzmolekülen. Es ist nicht auszuschließen, dass diese unerwartete Lokalisation auf fehlerhafte Proteinfaltung zurückzuführen ist.

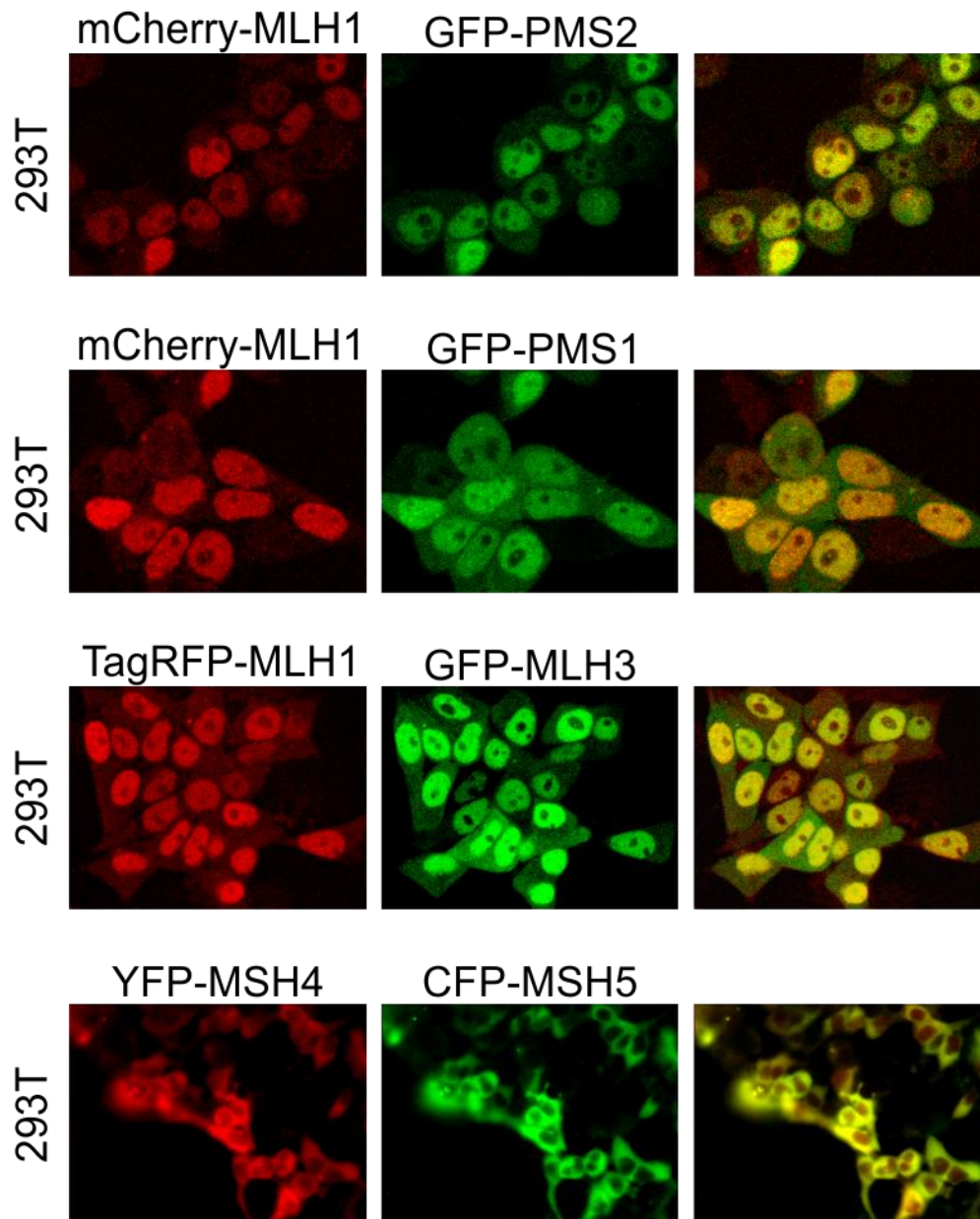


Abb.3.8 Co-Expression rekombinanter MMR-Proteine in Fusion mit Fluoreszenzproteinen. Zeilenweise sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des vom ersten und zweiten Cistron codierten Fusionsproteins, sowie eine Überlagerung der Fluoreszenzen exemplarischer Einzelklone abgebildet. Für YFP-MSH4 und CFP-MSH5 wurden die Fehlfarben rot und grün gewählt, um eine Überlagerung der Fluoreszenzen darstellen zu können.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Bildung der Heterodimer-Komplexe MutL α , MutL β und MutL γ durch Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden konnte. MLH3 nimmt dabei eine Sonderstellung ein, da es als einziges Protein der MutL-Familie auch in Abwesenheit des Partnerproteins exklusiv im Zellkern lokalisiert ist. Dies stellt ein erstes Argument für natürliches Bindeverhalten und korrekte Proteinfaltung von MLH1, PMS2, PMS1 und MLH3 in Fusion mit dem Markergen dar. Die fluoreszenzmikroskopischen

Beobachtungen für MLH1, PMS2 und PMS1 sind darüberhinaus konsistent zu Berichten anderer Arbeitsgruppen.

Auf diese Weise konnte für alle rekombinanten Proteine, ausgenommen MSH4 und MSH5, erwartete Bindungskapazität gezeigt und damit Proteinfehlfaltung ausgeschlossen werden. Folgende Experimente zur Untersuchung der γ -Heterodimere konzentrieren sich aufgrund dieser Ergebnisse auf die Untersuchung des MutL γ -Heterodimers und MLH3.

Bindung weiterer endogener Partner durch die rekombinanten Proteine

Um weitere Bindungsmöglichkeiten des MLH3-Fusionsproteins zu prüfen, wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Affinitätschromatographie durchgeführt.

Dazu wurde zunächst ein Proteinlysate von Zellen eines Einzelklons der Linie 293 hergestellt, welcher das rekombinante Fusionsprotein GFP-His-MLH3 exprimiert. Neben dem Fluoreszenzprotein codiert dieses Konstrukt für eine Peptidsequenz von 6 Histidinen in Fusion mit dem Zielprotein. Wie unter 2.5.4 beschrieben, ist eine spezifische Affinitätssäule in der Lage, das entsprechende rekombinante Protein aufgrund dieses Histidin-tags zu binden. Aufgrund nicht-denaturierender Bedingungen während der Lysis sollten Struktur und Interaktionen der Proteine aufrechterhalten werden. Dies ermöglicht eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins in Verbindung mit Interaktionspartnern und deren Detektion im Western Blot. Zur Kontrolle wurde ein Proteinlysate parentaler Zellen der Linie 293 eingesetzt. Abb.3.9 zeigt Western Blots gegen verschiedene Proteine der MMR-Familie. Immunnachweis von MLH1 im Western Blot führt zu einem deutlichen Signal des endogenen Proteins auf einer Höhe von 80 kDa. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass die kurz darunter sichtbare Bande ein unspezifisches Signal des Antikörpers darstellt. Während im Falle der parentalen Linie 293 im Eluat der Affinitätssäule kein Signal für MLH1 detektiert wird, ist in der entsprechenden Probe der rekombinanten Zelllinie eine deutliche Bande zu erkennen.

Die Proteine MSH2, MSH6, MSH3 und PMS2 können in den Eluaten der Affinitätssäule mittels Immunnachweis nicht detektiert werden. Schwache Signale auf Hintergrundniveau, wie sie für PMS1 zu beobachten sind, können auf unspezifische Bindung des Proteins an das Säulenmaterial zurückgeführt werden.

Auf diese Weise konnte MLH1 eindeutig als Bindepartner von MLH3 detektiert und die Existenz von MutL γ -Komplexen in den etablierten Einzelklonen bewiesen werden. Die Bindung von endogenem MLH1 an das rekombinante Fusionsprotein schließt eine Fehlfaltung von MLH3 in Folge der Proteinfusion erneut aus.

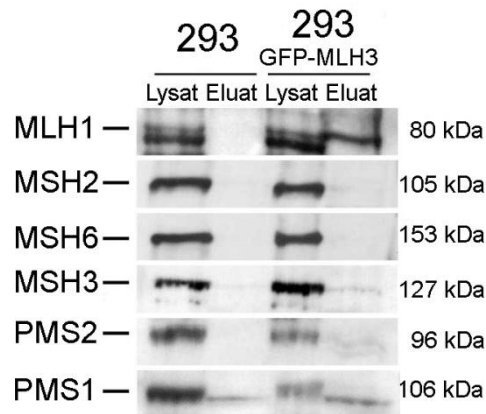


Abb.3.9 Nachweis von MLH3-Bindepartnern mittels Affinitätschromatographie. Stabil exprimierende 293-Zellen wurden lysiert und das rekombinante Fusionsprotein über Affinitätschromatographie nativ aufgereinigt. Ausgangslysate sowie die Eluate der Affinitätssäule wurden darauffolgend im Western Blot eingesetzt. Immunnachweis der angegebenen Proteine erfolgte über entsprechende Antikörper (s. 2.1.4). Parentale 293-Zellen wurden in der Kontrollreaktion eingesetzt.

Liegt MLH3 frei oder gebunden im Nucleus vor?

Wie in Abb.3.7 dargestellt, weist MLH3 eine Sonderstellung innerhalb der MLH1-Bindepartner auf, da für die nukleäre Lokalisation keine Heterodimerisierung notwendig ist. Dies könnte auf Bindung des Proteins an Strukturen des Zellkerns zurückzuführen sein. Fluoreszenzbasierte Experimente können Aufschluss über Dynamik, Lokalisation, Strukturgebundenheit oder Transport von Proteinen geben. *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) basiert auf dem irreversiblen Ausbleichen der Fluorophore von Fusionsproteinen durch intensive Bestrahlung mit Licht der Anregungswellenlänge. Das Ausbleichen eines definierten Bereichs innerhalb des Zellkerns führt im Falle von ungebundenem Protein zur Wiederherstellung der Färbung durch Diffusion ungebleichter Moleküle in die bestrahlte Region. An Struktur gebundene Moleküle dagegen diffundieren weder aus der gebleichten Region hinaus, noch in sie hinein. Durch Zeitserien von Bildaufnahmen können spezifische Kinetiken dokumentiert und Aussagen über die Mobilität von Proteinen gemacht werden.

Vorbedingungen für FRAP

Um die Mobilität von MLH3 im Nucleus zu determinieren, wurden zunächst für jeden zu untersuchenden Einzelklon Bedingungen ermittelt, mit denen das FRAP-Experiment durchgeführt werden kann. In erster Linie muss dabei die Menge an Laserenergie festgestellt werden, die nötig ist, um 100 % der Moleküle der bestrahlten Region auszubleichen. Die Bestrahlungsintensität wird dabei über die Anzahl von Zyklen eingestellt, mit denen der Laser die definierte Region rastert.

Um das Experiment zu kontrollieren, wurde auch die Mobilität von PCNA gemessen. PCNA stellt sowohl eine Kontrolle für gebundenes, als auch für freies Protein dar, da es während der S-Phase mit der DNA assoziiert und in G1 und G2 ungebunden im Nucleus vorliegt. Die Determination der Zellzyklusphase erfolgte dabei anhand spezifischer Muster, die das Protein in der Zelle bildet (Ersoy et al. 2009).

FRAP

Die empirisch determinierten Intensitäten wurden auf das *live cell imaging*-System übertragen. Unter physiologischen Bedingungen wurde durch Serienaufnahmen im Abstand von je 2 Sekunden die Erholung der Fluoreszenz des ausgebleichten Bereiches dokumentiert (Abb.3.10). Zur Durchführung des Kontroll-Experiments anhand von PCNA wurden sowohl sich in der S-Phase befindliche, als auch G1/G2-Phase-Zellen im Versuch eingesetzt. Die Dokumentation der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit zeigt für TagRFP-PCNA während der G1- oder G2-Phase eine Erholung zu 100 % nach 40 s. Im Gegensatz dazu erfolgt nach dem Ausbleichen von TagRFP-PCNA der S-Phase innerhalb des betrachteten Zeitraums keine Wiederherstellung der Fluoreszenz. Diese Daten bestätigen vorherige Arbeiten, die eine Fluoreszenzwiederherstellung für fluoreszenzfusioniertes PCNA während der S-Phase erst nach 3-15 min berichten und diesen Effekt auf Immobilisierung an den Replikationsgabeln zurückführen (Essers et al. 2005; Schermelleh et al. 2005; Sporbert et al. 2005).

Die Kinetik von GFP-MLH3 verhält sich deckungsgleich mit der von PCNA während der G1/G2-Phase. Das Experiment belegt, dass MLH3 ungebunden vorliegt und nicht an Strukturen innerhalb des Zellkerns gebunden ist.

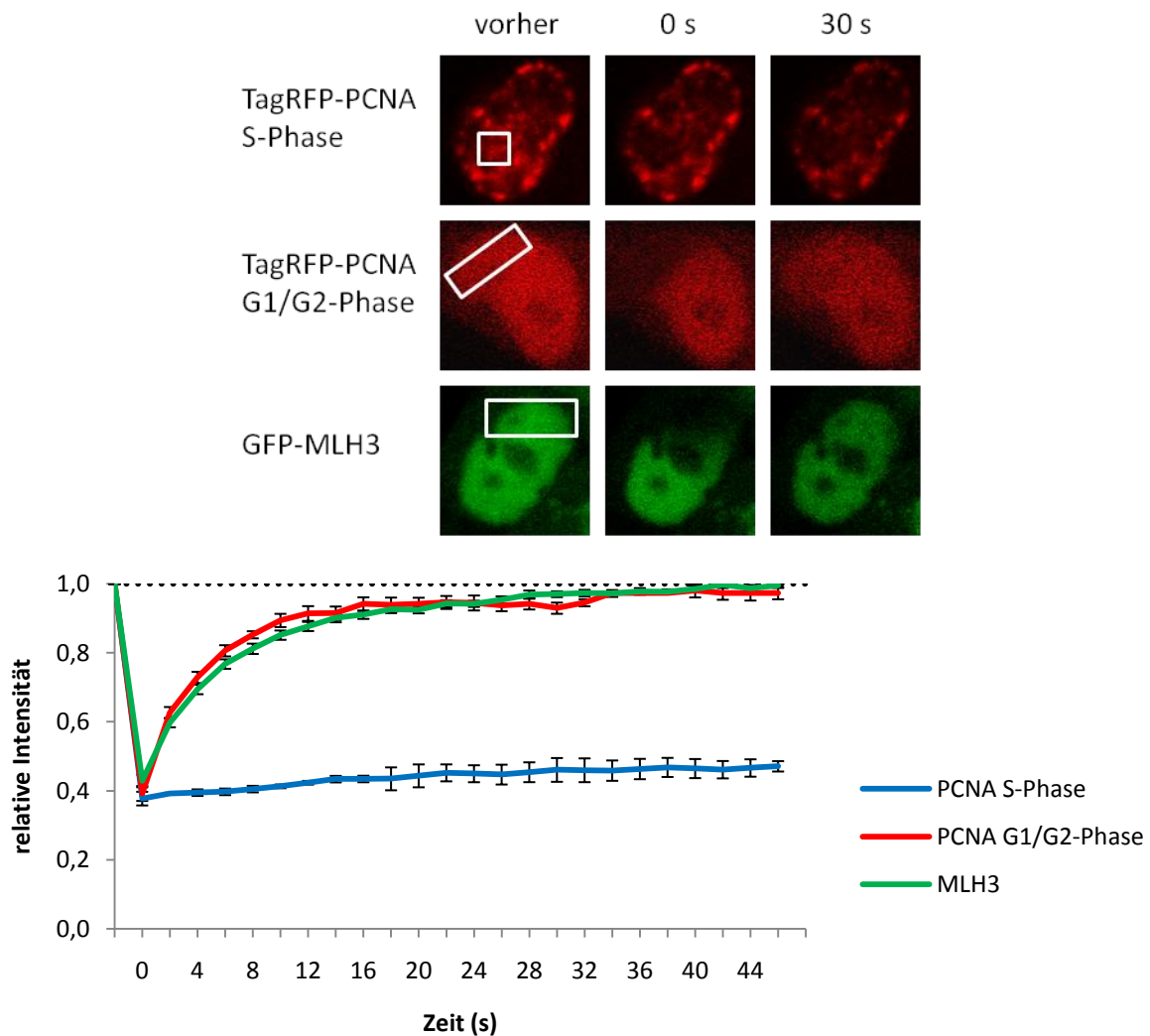


Abb.3.10 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP). Messung der Wiederherstellung der Fluoreszenz eines definierten ausgebleichten Bereichs des Zellkerns. HT-1080-Einzelklone, die tricistronisch sowohl TagRFP-PCNA als auch GFP-MLH3-P exprimieren, wurden im Versuch eingesetzt. In den beispielhaften Fluoreszenzaufnahmen wird das unterschiedliche Verteilungsmuster von rekombinantem PCNA während der verschiedenen Zellzyklusphasen deutlich. Kurven repräsentieren bis zu 18 unabhängige Wiederholungen. Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler des arithmetischen Mittels dar.

3.3.2 Welche MutL-Heterodimere sind an der DNA-Reparatur beteiligt?

Der folgende Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit Funktionen der MMR-Komplexe MutL α , MutL β und MutL γ in DNA-Reparatur. Während eine Beteiligung von MutL α an verschiedenen humanen Reparaturmechanismen beschrieben wurde, wurden derartige Funktionen für MutL β und MutL γ bisher nicht gezeigt. Besonderes Interesse besteht in der Untersuchung von MLH3, da es wie PMS2 über eine intrinsische Endonuklease verfügt.

Akkumulieren MutL-Heterodimere nach UVA-Induktion von DNA-Schäden?

Verschiedene Arten induzierter DNA-Schäden können angewandt werden, um eine Antwort von Reparaturproteinen zu untersuchen. Vorangegangene Arbeiten konnten eine Akkumulation von MMR-Proteinen nach Bestrahlung mit UV-Licht zeigen (Dissertation A. Siebert 2007; Hong et al. 2008), darunter MSH2, MSH3, MSH6 und MLH1. Im Gegensatz zu chemisch induzierten Zellschäden bieten derartige Lasertechniken die Möglichkeit der Beobachtung von Effekten unmittelbar nach der Schädigung. Kurzwelliges, energiereiches Licht des UVA-Spektrums wird dabei auf einen definierten Bereich des Zellkerns appliziert. Im Gegensatz zu Bestrahlung durch Licht mit Wellenlängen > 400 nm wird durch UVA-Bestrahlung primär die DNA des Zellkerns geschädigt. Ein Ausbleichen von Fluoreszenzmolekülen, wie es im FRAP-Experiment (Abb.3.10) genutzt wurde, tritt hier als zu vernachlässigender Nebeneffekt auf. In Folge derartiger Strahlung wurde die Entstehung verschiedener Arten von DNA-Schäden beobachtet, darunter oxidative Schäden, Einzel- aber auch Doppelstrangbrüche (Lan et al. 2004).

Im Folgenden werden die MMR-Proteine PMS2, PMS1 und MLH3 bezüglich der DDR untersucht. Es soll geklärt werden, ob eine Akkumulation an Orten induzierten DNA-Schadens auftritt, ob in Hinsicht auf Geschwindigkeit und Persistenz Vergleichbarkeit zu vorangegangenen Arbeiten gegeben ist und ob Abhängigkeiten von anderen Proteinen bestehen. Dazu werden Einzelklone verwendet, die sowohl MLH1 als auch eines der Bindeproteine, PMS2, PMS1 bzw. MLH3, rekombinant co-exprimieren, um eindeutige Lokalisation im Nucleus zu gewährleisten.

Abb.3.11 zeigt von links nach rechts die Fluoreszenz der Zelle vor und nach der UVA-Bestrahlung. Schon nach einer Minute ist eine deutliche Akkumulation von PMS1, PMS2 und MLH3 am Ort des Schadens zu erkennen, wobei jeweils eine Co-Lokalisierung mit MLH1 vorliegt. Kontrollzellen, die den Ausgangsvektor und damit einzig EGFP rekombinant exprimierten, zeigen keine Fluoreszenzakkumulation in derartigen Experimenten (ohne Abbildung).

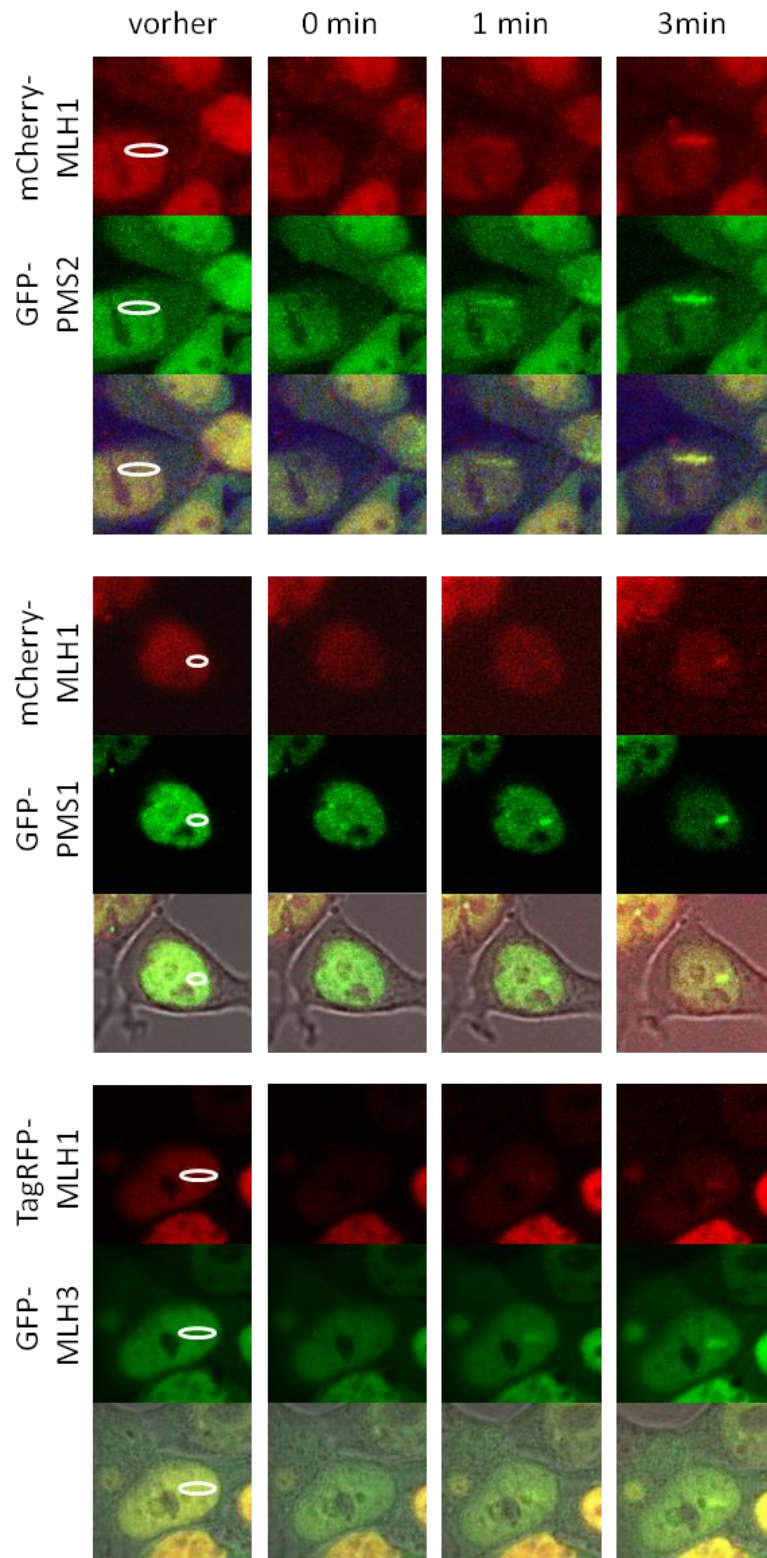


Abb.3.11 Akkumulation von MutL-Heterodimeren nach UV-Induktion von DNA-Schäden. Durch jede Bestrahlung wurden 250 J/cm^2 ($\lambda = 364 \text{ nm}$) auf einen definierten Bereich der Größe $5,5 \mu\text{m} \times 550 \text{ nm}$ innerhalb eines Zellkerns appliziert. Hier dargestellte Bilder, die 1 und 3 min nach der Bestrahlung aufgenommen wurden, repräsentieren eine Serie von Aufnahmen im Abstand von je 30 s. Der bestrahlte Bereich ist als weißes Oval in der jeweils ersten Aufnahme gekennzeichnet.

Sind die akkumulierten Proteine am Ort des Schadens gebunden?

Genauere Untersuchungen zur Persistenz des akkumulierten Fusionsproteins am Ort des Schadens wurden durchgeführt, um eine Aussage über die beobachtete Foci-Formation am Schaden treffen zu können. Dies erfolgte für GFP-fusioniertes MLH3 mittels einer Kombination aus FRAP und UVA-vermitteltem DNA-Schaden. In diesem Experiment wurden in zwei definierten Regionen eines Zellkerns wie beschrieben mittels UVA-Licht DNA-Schäden induziert. 5 Minuten nach der Bestrahlung wurde einer der akkumulierten Fluoreszenzfoci mit der Anregungswellenlänge ausgebleicht und die Erholung der Fluoreszenz analog zum FRAP-Protokoll gemessen. Der zweite Fluoreszenzfoci diente hier als Referenz.

Abb.3.12 zeigt anhand von Beispielbildern sowohl ein klassisches FRAP-Experiment als auch den hier angewandten Versuchsablauf anhand von GFP-MLH3. Der Vergleich der Kurven der relativen Fluoreszenzintensität zeigt deutliche Unterschiede. Während sich ohne DNA-Schaden die Fluoreszenz im gebleichten Bereich zu 100 % erholt, wird am Ort induzierten DNA-Schadens lediglich 80 % des Referenzniveaus erreicht.

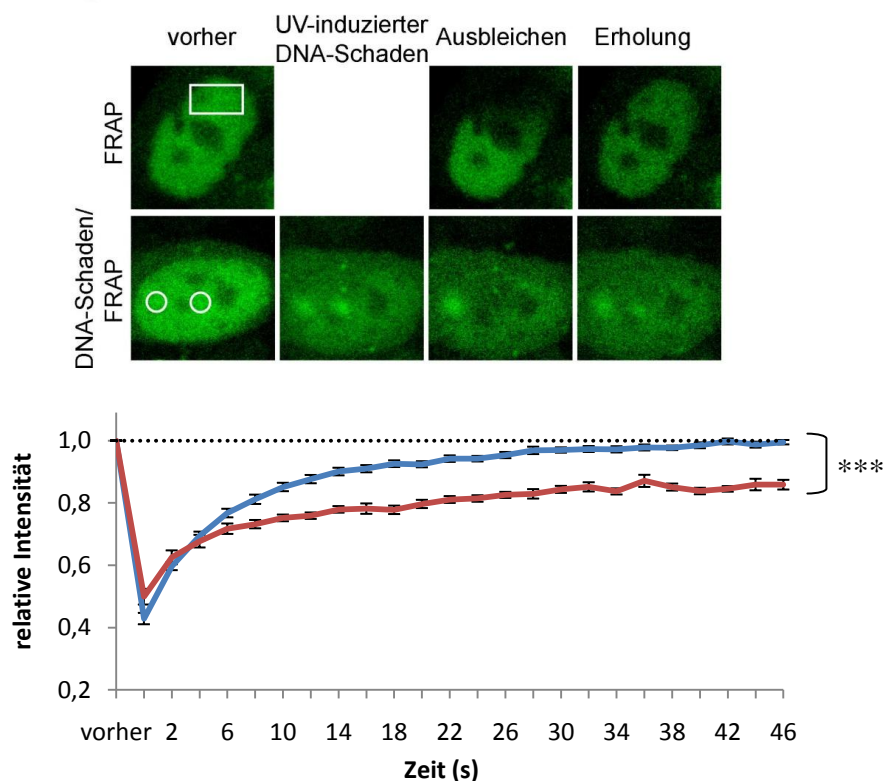


Abb.3.12 Kombination aus UV-induziertem DNA-Schaden und FRAP. Obere Reihe/blau Kurve: FRAP-Experiment für GFP-MLH3 entsprechend 2.3.2. Untere Reihe/rote Kurve: UV-vermittelter DNA-Schaden führt zur Akkumulation von GFP-MLH3-Molekülen an zwei distinkten Foci. Wiederherstellung der Fluoreszenz nach Ausbleichen eines Foci wird durch Aufnahmen im Abstand von 2 s dokumentiert. Kurven repräsentieren mindestens 10 unabhängige Wiederholungen. Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler des arithmetischen Mittels dar. Ein statistisch signifikanter Unterschied ist durch einen 2-seitigen t-Test infolge eines Tests auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) nachweisbar.

Das Plateau von 80 % relativer Fluoreszenz ist auf ein Verbleiben von 20 % gebleichter Fusionsproteine im bestrahlten Bereich zurückzuführen und belegt damit eine Persistenz von MLH3-Molekülen am Ort von UV-induzierten DNA-Schäden. Ähnlich aufgebaute Experimente anderer Arbeitsgruppen führten für weitere Proteine zu vergleichbaren Ergebnissen (s. 4.6.2). Die auf diese Weise nachgewiesene Bindung unterstützt ein Modell, in dem die untersuchten Proteine durch Beteiligung an einer übergeordneten Reparaturstruktur der Zelle, dem sog. Repairosom, an der Antwort auf DNA-Schäden beteiligt sind.

Ist die Akkumulation abhängig von der Heterodimerisierung mit MLH1?

Während die Schadensantwort von MLH1, PMS2 und PMS1 in Abwesenheit von Bindepartnern aufgrund mangelnder Kernlokalisierung nicht untersucht werden kann, sollte die Sonderstellung von MLH3 diesbezüglich mittels UVA-vermitteltem DNA-Schaden näher untersucht werden. Um einen Vergleich zu ermöglichen, soll die schadensvermittelte Akkumulation anhand von Kinetiken dokumentiert werden.

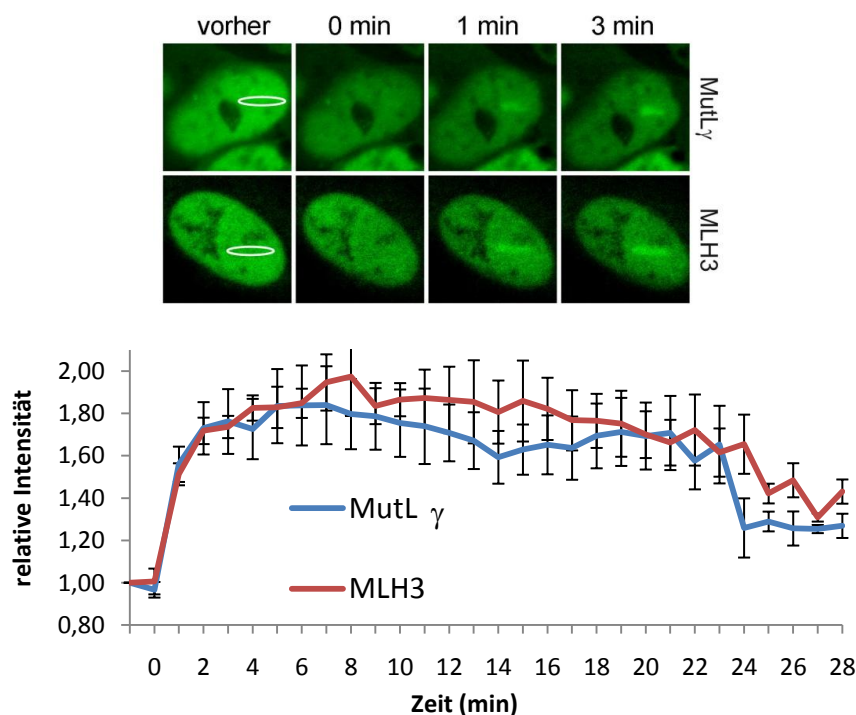


Abb.3.13 Akkumulation von GFP-MLH3 nach UV-Induktion von DNA-Schäden in An- und Abwesenheit von MLH1. Messung der Akkumulation erfolgte durch Aufnahmen im Abstand von je 60 s. Eingesetzt wurden rekombinante Einzelklone der Zelllinie 293T, welche GFP-MLH3 entweder bicistronisch oder tricistronisch in Kombination mit TagRFP-MLH1 exprimierten. Die Erstellung der Kinetiken erfolgt über softwaregestütztes Auslesen der Pixel des Fluoreszenzfoci, des Nucleus sowie des Bildhintergrundes. Daher kann die relative Intensität des Fluoreszenzproteins am Ort des Schadens im Vergleich zur Fluoreszenz des Zellkerns bewertet werden. Kurven repräsentieren mindestens 6 unabhängige Wiederholungen. Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler des arithmetischen Mittels dar.

Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass MLH3 auch in Abwesenheit von MLH1 am Ort des Schadens akkumuliert. Es konnte darüber hinaus belegt werden, dass die Geschwindigkeit der Entwicklung, die Persistenz und die relative Intensität der Schadens-Foci von MLH3 in An- und Abwesenheit von MLH1 identisch sind (Abb.3.13).

Zunächst kann festgehalten werden, dass die Akkumulation der rekombinanten Proteine mit vergleichbaren Kinetiken zu bekannten Daten in Bezug auf Einsetzen, Persistenz und Abklingen der Foci erfolgte (Dissertation A. Siebert 2007; Hong et al. 2008). Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass neben der Lokalisation im Nucleus auch die Antwort auf DNA-Schäden des Proteins MLH3 unabhängig von der Heterodimerisierung mit MLH1 erfolgt.

Die Beobachtung, dass der prominente Heterodimerisierungspartner MLH1 für eine Antwort von MLH3 auf DNA-Schaden nicht benötigt wird, eröffnet Spielraum für neue Modelle der MLH3-Funktion. Denkbar ist Aktivität von MLH3 als Monomer, bei der keine Bindung an Partnermoleküle in DDR notwendig ist. Es kommt jedoch genauso ein Modell in Betracht, in dem MLH3 eine Bindung mit weiteren MLH3-Molekülen eingeht und in Form eines Homodimers oder Homomultimers als aktiver Proteinkomplex eine Funktion trägt. Ein drittes Modell beinhaltet die Bindung von MLH3 an bis jetzt nicht identifizierte Proteinpartner, welche in Konkurrenz zu MLH1 zur Dimerisierung geeignet sind.

Homodimerisierung ist für MMR-Proteine aus dem bakteriellen Reparaturmechanismus in *E. coli* bekannt. Hohe Sequenzhomologien von MLH3 zu *E. coli* MutL argumentieren daher für eine derartige Bindung.

Liegt MLH3 als Homodimer im Zellkern vor?

Eine mögliche Rolle von MLH3-Mehrfachkomplexen in der Schadensantwort sollte über die Bindungsmöglichkeit des Proteins mit sich selbst geklärt werden. Wie zuvor beschrieben, ermöglicht die Co-Immunpräzipitation Nachweis von Bindungen zwischen unterschiedlichen nativen Proteinen (2.5.5). Um sich bindende MLH3-Moleküle unterscheiden zu können, wurden diese mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen fusioniert. Spezifische Antikörper, gerichtet gegen die Fluoreszenzproteine, sollen anschließend eine Homodimerisierung mittels Co-IP ermöglichen. Dazu wurde ein tricistronisches Vektorkonstrukt konstruiert, welches im ersten Cistron für TagRFP-MLH3, im zweiten für GFP-MLH3 und im dritten für das selektive Markergen codiert. Die Expression erfolgte im MutL-negativen Hintergrund der Zelllinie 293T. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen stellten eine gleichmäßige Expression der unterschiedlich getagten Proteine sicher (Abb.3.14).

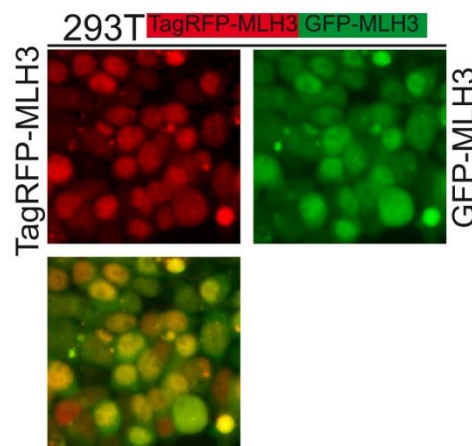


Abb.3.14 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines 293T-Einzelklons, welcher unterschiedlich getagte MLH3-Proteine exprimiert. Die Co-Lokalisierung der Fusionsproteine im Nucleus ist durch die Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzen zu erkennen.

Ausschluss der Kreuzreaktivität der Antikörper

Um die Ergebnisse korrekt interpretieren zu können, musste zuvor eine potentielle Kreuzreaktivität der Antikörper ausgeschlossen werden. Erkennung von GFP-tags durch den TagRFP-Antikörper oder umgekehrt würde zu falsch positiven Ergebnissen führen. Zu diesem Zweck wurden Western Blots an Lysat MutL γ -exprimierender 293T-Zellen mit beiden Antikörpern durchgeführt. Wie in Abb.3.15 erkennbar, wird das Signal für GFP-MLH3 der Größe 190 kDa einzig durch den α GFP-Antikörper detektiert, während das Signal für TagRFP-MLH1 in Höhe 110 kDa lediglich mittels α TagRFP-Antikörper sichtbar wird. Eine Kreuzreaktivität der Antikörper im Western Blot ist damit nicht gegeben.

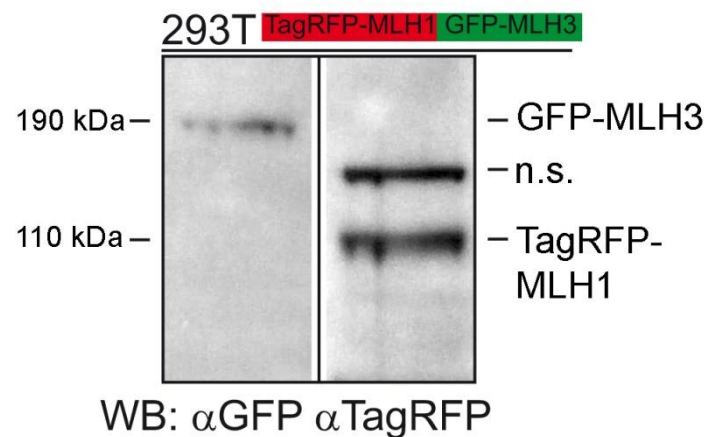


Abb.3.15 Ausschluss einer Antikörper-Kreuzreaktivität von α GFP und α TagRFP. Western Blot eines Lysats rekombinanter 293T-Zellen, welche TagRFP-MLH1 und GFP-MLH3 co-exprimieren. Der eingesetzte α GFP-Antikörper detektiert lediglich das spezifische Signal des Fusionsproteins von 190 kDa. Für den α TagRFP-Antikörper ist neben der erwarteten Bande auf Höhe von 110 kDa auch eine unspezifische Bande zu erkennen. Das jeweils andere Fusionsprotein wird jedoch in beiden Fällen nicht detektiert.

Co-Immunpräzipitation von MLH3

Wie unter 2.5.5 beschrieben, wird in der Co-Immunpräzipitation die Bindung eines Köderproteins über spezifische Antikörper an eine Matrix, in diesem Fall Protein-G beschichtete Sepharose-beads, vermittelt. Bindepartner dieses Proteins können auf diese Weise zusammen mit dem Köder aufgereinigt und im Western Blot detektiert werden. Eine unspezifische Bindung der Fluoreszenzproteine an Sepharose wurde im Vorfeld des Experiments ausgeschlossen. Als Kontrolle wurde in diesem Versuch ein MLH1/MLH3 co-exprimierender Einzelklon eingesetzt. Abb.3.16a zeigt die erfolgreiche Co-Immunpräzipitation der Kontrollreaktion.

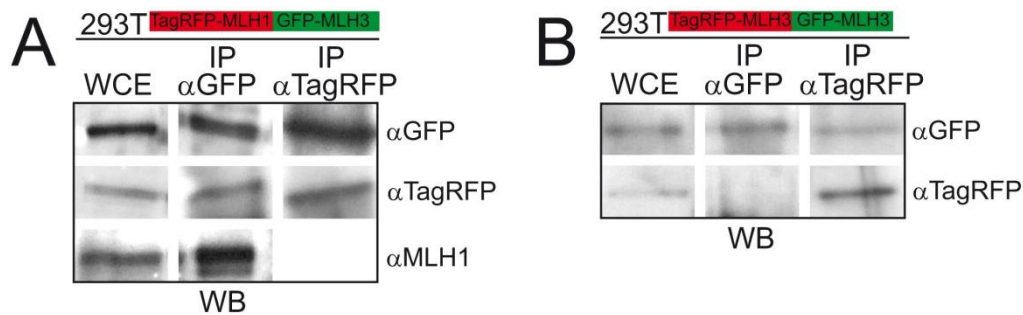


Abb.3.16 Co-Immunpräzipitation rekombinanter Proteine des MutLγ-Heterodimers sowie unterschiedlich fluoreszenzfusionierter MLH3-Proteine. Western Blots der Ausgangslysate (WCE) und immunpräzipitierter Eluate (IP) wurden anhand der angegebenen Antikörper durchgeführt.

Western Blotting der Ausgangslysate (WCE, *whole cell extract*) führt zunächst zu distinkten Banden für TagRFP-MLH1 und GFP-MLH3 (Abb.3.16a, 1. Spalte). Auch nach Immunpräzipitation von GFP-MLH3 ist ein deutliches GFP-Signal im Western Blot detektierbar. Weiterhin konnte in diesem Eluat das TagRFP-getagte MLH1-Protein über verschiedene Antikörper detektiert werden (Abb.3.16a, 2. Spalte). Diese Bindung konnte durch Co-Immunpräzipitation mittels TagRFP-Antikörper reproduziert werden (Abb.3.16a, 3. Spalte). Folglich wird einerseits die Bildung von MutLγ-Heterodimeren bestätigt (s. Abb.3.9) und andererseits die Möglichkeit der gegenseitigen Bindung zweier fluoreszenzfusionierter Proteine belegt.

Abb.3.16b zeigt das Ergebnis der Co-Immunpräzipitation von MLH3 mit MLH3. Western Blot-Signale gleicher Größe sind in den Ausgangslysaten erkennbar (Abb.3.16b, 1. Spalte). Nach IP mittels αTagRFP sind sowohl TagRFP- als auch GFP-fusioniertes MLH3 detektierbar (Abb.3.16b, 3. Spalte), was eine Bindung beider Fusionsproteine anzeigt. Diese Protein-Protein-Interaktion zeigt daher die Existenz von Homodimeren oder größeren Komplexen in Form von Homo-Multimeren in humanen Zellen.

Das vice-versa-Experiment unter Verwendung des GFP-Antikörpers konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduzieren, was auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein kann (s. 4.6.5). Eine erste Vermutung legt nahe, dass native TagRFP-Epitope durch die Proteinfusion mit MLH3 maskiert werden.

Welche Domänen von MLH3 vermitteln die Akkumulation am Ort des Schadens?

Ausgehend von der Beobachtung der Akkumulation von MLH3 am Ort des Schadens wurde parallel zu den biochemischen Bindungsstudien das rekombinante Protein molekularbiologisch untersucht. Zur Determination der Bereiche des Proteins, welche die

Bindung am Ort induzierten Schadens vermitteln, wurden verschiedene verkürzte Versionen von MLH3 (s. 2.2.8; 3.2) bezüglich der Akkumulation nach Bestrahlung analysiert.

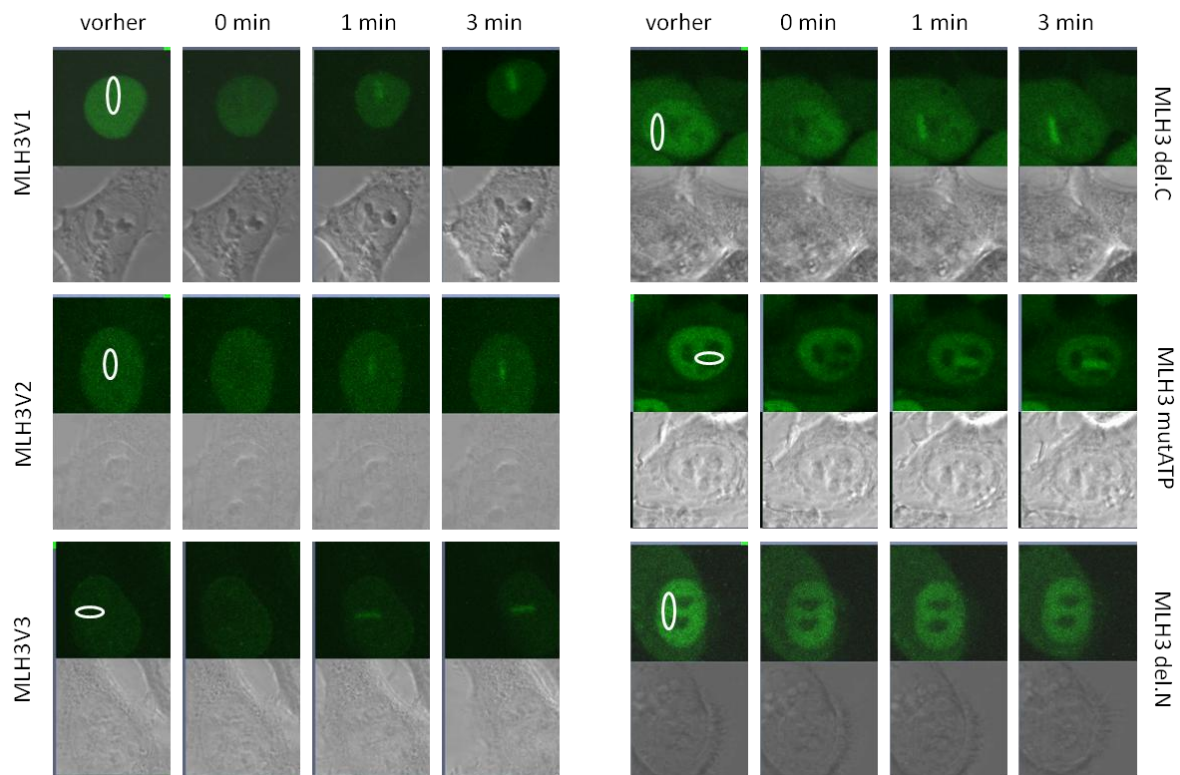


Abb.3.17 Akkumulation von MLH3-Varianten und -Mutanten nach UV-Induktion von DNA-Schäden. Die Versionen MLH3V1-V3 gehen vermutlich auf alternatives Spleißen zurück und zeichnen sich durch Abwesenheit des zentralen Endonuklease-Motivs aus. V1 stellt darunter eine bereits beschriebene Isoform von MLH3 dar. MLH3del.C wurde so verkürzt, dass die Domäne mit der stärksten Bindeaffinität zu MLH1 nicht exprimiert wird. MLH3mutATP weist eine Mutation innerhalb des hochkonservierten ATPase-Motivs der GHKL-Familie auf, während MLH3del.N eine Deletion des Aminoterminus und damit auch der ATPase-Domäne aufweist (s. 3.2). Für alle verkürzten Proteine mit Ausnahme MLH3del.N ist Akkumulation am Ort des Schadens detektierbar.

Alle Proteinversionen wurden wie unter 2.6.4 beschrieben gezielt mit UVA-Licht bestrahlt. Wie in Abb.3.17 zu erkennen ist, reagieren die Versionen V1, V2 und V3 wie der Wildtyp und formen innerhalb von Sekunden am Ort des Schadens Foci, was auch für die Deletionsmutanten del.C und mutATP der Fall ist. Für die N-terminal verkürzte Mutante ist jedoch keine Akkumulation erkennbar.

Die Foci-Formation von MLH3-V1, V2 und V3 ist konsistent zu Beobachtungen für PMS1 (Abb.3.11), welches sich am Ort des Schadens ansammelt, aber ebenfalls nicht über das Endonuklease-Motiv verfügt. Foci-Formation von MLH3-del.C ist konsistent zu Beobachtungen der Akkumulation von MLH3-WT in rekombinanten 293T-Zellen, in denen ebenfalls keine Bindung zu MLH1 stattfinden kann. Interessanterweise ist die DDR unabhängig von Bindung und Hydrolyse von ATP, wie MLH3-mutATP belegt. Diese Daten

werden weiterhin dadurch bestätigt, dass Hemmung der ATPase-Funktion durch das Chemotherapeutikum ICRF-187 keinen Einfluss in der UV-vermittelten Schadensantwort zeigt (nicht dargestellt). Dennoch kann festgestellt werden, dass in Abwesenheit des N-Terminus keine Akkumulation des Proteins als Reaktion auf DNA-Schaden auftritt.

Zusammenfassung

Abschließend kann festgehalten werden, dass der N-terminale Bereich für die Akkumulation am Ort des DNA-Schadens notwendig ist. Dabei ist eine direkte Bindung dieses Bereiches an DNA oder Protein denkbar. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch, dass die Deletion zu strukturellen Veränderungen oder Fehlfaltung des Proteins führt und die Akkumulation daher nicht zustande kommt.

Auffällig ist weiterhin, dass neben PMS1 auch die Isoformen V1-V3 ohne das hochkonservierte Endonuklease-Motiv deutliche Foci-Formation nach UV-Bestrahlung zeigen. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Akkumulation unabhängig vom Einschneiden des fehlerhaften Strangs stattfindet. Die Untersuchung einer Beteiligung von MLH3 an MMR muss daher auf andere Weise erfolgen.

3.3.3 Welche MutL-Heterodimere sind an MMR beteiligt?

Nach der Untersuchung der Antwort auf DNA-Schäden soll eine Beteiligung der MutL-Heterodimere an MMR untersucht werden. DNA Mismatch Reparatur ist in erster Linie ein post-replikativer Prozess. Zur Untersuchung einer Funktion in MMR wurde daher die Expression von GFP-MLH3 in verschiedenen Stadien des Zellzyklus über die Fluoreszenz beobachtet.

Ist MLH3 während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus immobilisiert?

Da eine Langzeitbetrachtung der Fusionsproteine zu raschem Ausbleichen führt, wurde der Zellzyklus-Status durch Co-Expression mit fluoreszenzfusioniertem PCNA determiniert. PCNA ist als Marker für verschiedene Stadien der S-Phase bekannt (Ersoy et al. 2009). Nach der Bestimmung der Zellzyklusphase wurde die Fluoreszenz des co-exprimierten MLH3 dokumentiert. Darüberhinaus erfolgte die Induktion eines DNA-Schadens über UVA-Bestrahlung während G1-, G2- und verschiedenen Stadien der S-Phase. Eine Beteiligung von MLH3 an post-replikativer MMR sollte anhand einer Immobilisierung während der S-Phase oder schwankender Expressionsniveaus untersucht werden.

Abb.3.18 zeigt die verschiedenen Verteilungs-Muster der Fluoreszenz des immobilisierten TagRFP-PCNA. Das co-exprimierte GFP-MLH3 ist dagegen zu jedem beobachteten Zeitpunkt homogen im Zellkern verteilt und zeigt keine spezifischen Muster. Die Induktion von DNA-Schäden führt zur Foci-Formation sowohl von MLH3 als auch von PCNA. Während der Mitte der S-Phase ist für PCNA eine deutlich verringerte Akkumulation am Ort des Schadens zu erkennen (Abb.3.18, Mitte).

Das spezifische Muster, das PCNA während der S-Phase bildet, geht auf grundlegende Funktionen des Proteins während der Replikation zurück. Die homogene Verteilung von MLH3 während der betrachteten Stadien liefert verglichen dazu keinen direkten Hinweis auf eine Funktion während der Replikation. Es ist aber nicht auszuschließen, dass eine Lokalisation z.B. an Fehlpaarungen lediglich aufgrund der Unterschreitung des Detektionslimits nicht detektiert wird, da die Anzahl an Molekülen zu gering ist, um sich von der Hintergrundfluoreszenz abzuheben.

PCNA stellt einen wesentlichen Bestandteil verschiedener DNA-Reparaturpathways dar und die Lokalisation an UVA-Schäden wurde mehrfach nachgewiesen (Mortusewicz und Leonhardt 2007). Die verringerte Intensität der Reaktion auf UV-induzierte Schäden während der Mitte der S-Phase ist auf die Immobilisierung an den Replikationsgabeln zurückzuführen. Dass im Gegensatz dazu keine Veränderung der Intensität der MLH3-Akkumulation zu

beobachten ist, liefert ebenfalls keinen Hinweis auf Beteiligung von MLH3 in postreplikativer MMR. Dennoch kann diese anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Andererseits wird deutlich, dass die Antwort auf UV-induzierte Schäden während des gesamten Zellzyklus stattfinden kann. Die DDR der MMR-Proteine kann demnach als ein Standby-System zur Antwort auf DNA-Läsionen betrachtet werden.

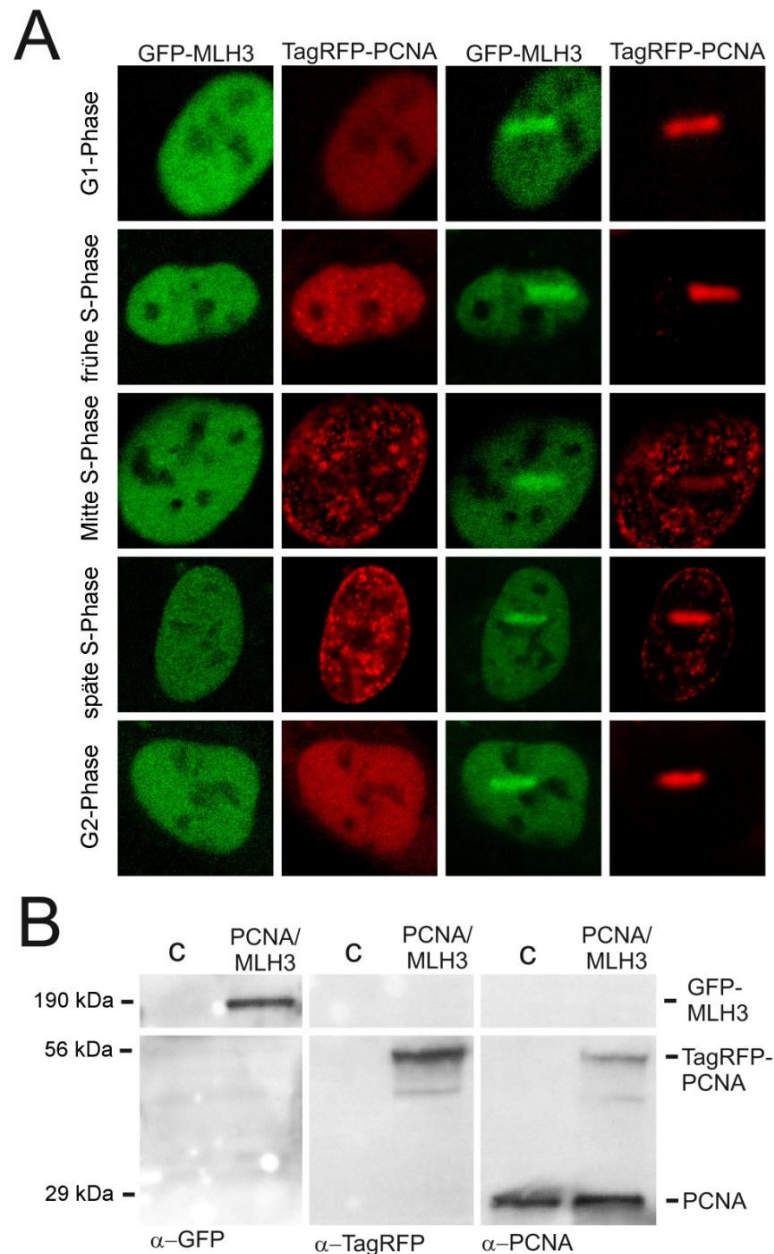


Abb.3.18 Detektion der Fluoreszenz von TagRFP-PCNA und GFP-MLH3 in verschiedenen Stadien der S-Phase. A: Für jedes Stadium ist die Fluoreszenz von GFP und TagRFP einer Zelle vor und nach Induktion eines DNA-Schadens dargestellt. Das tricistronische Vektorkonstrukt wurde in diesem Experiment in der Zelllinie HT-1080 exprimiert, um die Immobilisierung von PCNA möglichst genau detektieren zu können (s. 3.2). B: Western Blot mit Antikörpern gegen GFP, TagRFP und PCNA des in A verwendeten Einzelklons. Das GFP-MLH3-Fusionsprotein wird wie erwartet in Höhe von 190 kDa detektiert. Während endogenes PCNA sowohl in parental HT-1080-Zellen (c) als auch im Einzelklon in Höhe von 29 kDa erkennbar ist, wird das rekombinante durch den α TagRFP-Antikörper in Höhe von 56 kDa detektiert.

MMR-unabhängige Beobachtung von MLH3 während der Mitose

Die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung des weiteren Verlaufs des Zellzyklus sollte die Verteilung von MLH3 während der folgenden Phase, der Teilung humaner Zellen, dokumentieren. Durch konfokale Mikroskopie wurden Serienaufnahmen entlang der Z-Ebene von sich in der Mitose befindlichen rekombinanten Zellen erstellt. Dabei wurden zwei distinkte, schadensunabhängige Foci pro Zelle sichtbar (Abb.3.19a).

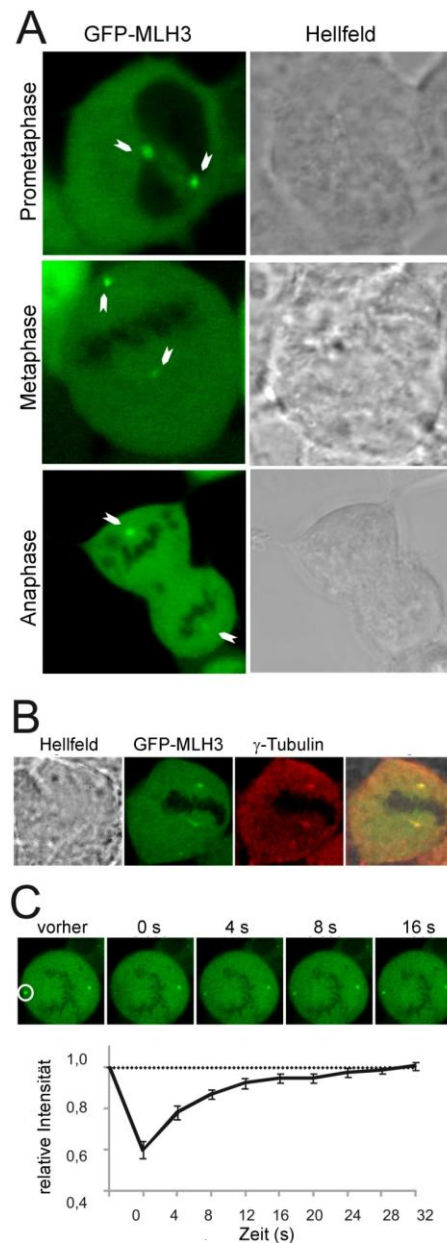


Abb.3.19 MLH3 akkumuliert an den Centrosomen. A: Konfokale Aufnahmen verschiedener Phasen der Mitose. GFP-MLH3 akkumuliert an 2 schadensunabhängigen Foci in der Zelle (weiße Pfeile). B: Immunfärbung des centrosomen-assoziierten Proteins γ -Tubulin sowie Darstellung der Co-Lokalisation mit GFP-MLH3 während der Metaphase. C: FRAP centrosomaler Foci von GFP-MLH3. Die 100%ige Wiederherstellung der Fluoreszenz wurde durch Aufnahmen im Abstand von 4 s dokumentiert. Die Kurve repräsentiert Daten aus 8 unabhängigen Messungen. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des arithmetischen Mittels. In dieser Darstellung sind beispielhaft Zellen abgebildet, in denen die 2 Foci in derselben Fokalebene detektiert wurden.

Die Positionierung der GFP-MLH3-Foci auf je einer Seite der Äquatorialebene während der Metaphase legte eine Lokalisierung von MLH3 an den Centrosomen nahe. Immunfärbung mit einem Antikörper gegen das Centrosom-assoziierte γ -Tubulin bestätigte dies über Co-Lokalisierung mit MLH3-Foci (Abb.3.19b). Weiterhin wurde ein FRAP-Experiment an den centrosomalen Foci durchgeführt. Eine 100%ige Wiederherstellung der Fluoreszenz am ausgebleichten Punkt konnte nach 28 Sekunden beobachtet werden, wodurch eine hohe Dynamik von MLH3 an den Centrosomen beschrieben wird (Abb.3.19c).

Durch die Eigenschaft konfokaler Mikroskopie, das sichtbare Bild auf die Schichtdicke der Fokalebene zu beschränken, konnten Strukturen sichtbar werden, die in der Epifluoreszenz durch die Betrachtung der gesamten, sich überlagernden Fluoreszenzmoleküle einer Zelle untergehen. Diese Ergebnisse weisen auf eine neue Funktion von MLH3 während der Zellteilung in humanen somatischen Zellen hin. Da für MSH2 Funktionen in Aufrechterhaltung der Centrosomen berichtet wurden (Campbell et al. 2006), ist eine ähnliche Funktion für MLH3 vorstellbar.

Ist MLH3 an der schadensvermittelten Zellzykluskontrolle beteiligt?

Da eine Beteiligung von MLH3 in MMR bisher weder bestätigt, noch ausgeschlossen werden konnte, wurde ein weiterer Aspekt der MMR-Funktion untersucht. Wie einleitend dargelegt, besteht eine der vielfältigen Funktionen des MMR-Systems in der Auslösung eines Zellzyklusarrests nach irreparablen DNA-Schaden. Die Funktion von MutL α besteht dabei, analog zur Reparatur von Fehlpaarungen, im Einschneiden von Heteroduplex-DNA (Stojic et al. 2004). Da das Auslösen des G2/M-Arrests also ein Marker für Aktivität der intrinsischen Endonuklease darstellt, kann auf diese Weise überprüft werden, ob MLH3 fähig ist, Heteroduplex-DNA einzuschneiden.

Detektion des Zellzyklusarrests mittels Einzelzell-Gelelektrophorese

Temozolomid (TMZ) ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum, welches den MMR-abhängigen Zellzyklusarrest auslösen kann. In MMR-profizienten Zellen wird der Zellzyklusarrest nach der Einzelzell-Gelelektrophorese sichtbar (*single cell gelelectrophoresis*, SCE, auch *Comet Assay*), bei welcher ganze Zellen in einem Bett aus Agarose auf einem Objektträger fixiert werden. Nach Auflösen der Membranen wird ein elektrisches Feld angelegt, woraufhin die DNA durch die Agarose migriert (2.7). Aus wiederholter Reparatur resultierende *nicks* der DNA führen durch alkali-vermittelte Trennung des Doppelstrangs in Fragmentierung der DNA. Diese Fragmente migrieren mit

unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch das Gel, wodurch die DNA nach Färbung die Form eines Kometen annimmt, während intakte, hochmolekulare DNA im Gel immobil ist.

Die parentalen Zelllinien 293 und 293T dienten in diesem Experiment als Positiv- und Negativkontrollen für DNA-Mismatch Reparatur. Einzelklone der Zelllinie 293T, die durch Expression der Gene des MutL α -Komplexes, des MutL γ -Dimers oder von MLH3 rekonstituiert wurden, sollen hinsichtlich der Fähigkeit zur Auslösung des Zellzyklusarrests untersucht werden.

Abb.3.20 zeigt das Ergebnis der Auswertung des Comet Assays. Die Säulen des Diagramms repräsentieren die relative Anzahl kometenförmiger DNA-Spots, die nach der SCE gezählt wurden.

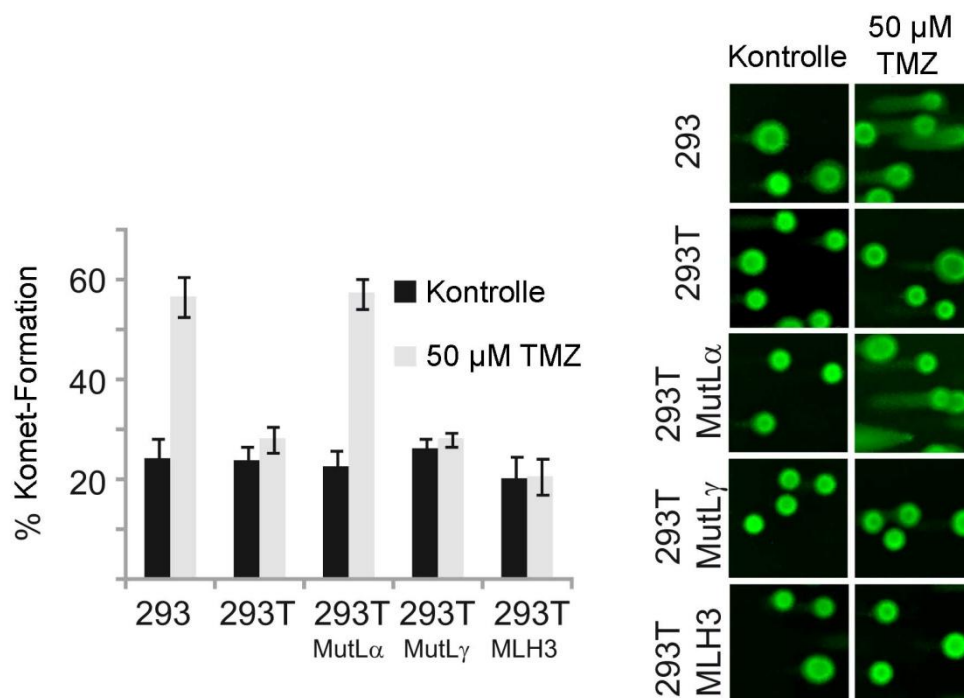


Abb.3.20 Einzelzell-Gelelektrophorese nach Temozolomid-Behandlung. Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis kometenförmiger zu intakter DNA. Graue Säulen repräsentieren Zellen nach TMZ-Behandlung, schwarze Säulen unbehandelte Kontrollen. Fluoreszenzaufnahmen belegen beispielhaft das Auftreten von kometenförmiger DNA nach SCE in behandelten Zellen der Linie 293 sowie 293T-Zellen nach Expression der Proteine des MutL α -Heterodimers. Für jedes Expressionskonstrukt wurden 7-18 Einzelklone eingesetzt; die Säulen stellen den Mittelwert aus den Experimenten dar. Für jeden eingesetzten Einzelklon wurden mindestens 50 Zellen analysiert. Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des arithmetischen Mittels.

Es wird deutlich, dass Zellen ohne TMZ-Behandlung zu etwa 25 % kometenförmige DNA-Spots aufweisen. Während für MMR-profiziente Zellen der Linie 293 nach TMZ-Behandlung eine Verdoppelung der Komet-Formation detektiert werden kann, zeigen MMR-defiziente 293T-Zellen kometenförmige DNA lediglich auf Hintergrundniveau. Der Anstieg der Komet-Formation nach TMZ-Behandlung ist wie beschrieben auf die erfolglose Reparatur in der

MMR-profizienten Zelllinie 293 zurückzuführen. Die Rekonstitution von 293T mit Genen des MutL α -Heterodimers, also MLH1 und PMS2, führte zu einem ebenso starken Anstieg kometenförmiger Zellen wie in der Positivkontrolle. Dieser Effekt konnte in mehreren Einzelklonen reproduziert werden und ist auf die Aktivität der rekombinanten MMR-Proteine des Einzelklons zurückzuführen. Die Auslösung des Zellzyklusarrests belegt, dass die Expression von MutL α in der Zelllinie 293T das MMR-System wiederherstellt und fehlerhafte DNA durch die Endonuklease PMS2 eingeschnitten wird.

Da auf diese Weise die Funktion des experimentellen Systems belegt wird, wurde darauffolgend untersucht, ob eine Rekonstitution des Zellzyklusarrests in 293T auch über die intrinsische Endonuklease von MLH3 bzw. MutL γ erfolgt. Da für MLH3 in vorangegangenen Experimenten mehrfach Unabhängigkeit von MLH1 gezeigt werden konnte, wurden zunächst GFP-MLH3 exprimierende 293T-Einzelklone bezüglich einer Rekonstitution des Zellzyklusarrests untersucht. Obwohl insgesamt 18 Einzelklone eingesetzt wurden, konnte jedoch keine erhöhte Komet-Formation detektiert werden (Abb.3.20). Um eine mögliche Wiederherstellung des G2/M-Arrests durch das MutL γ -Heterodimer zu untersuchen, wurden insgesamt sieben 293T-Einzelklone eingesetzt, die rekombinant MLH1 und MLH3 co-exprimieren. In Folge von TMZ-Behandlung und SCE konnte jedoch keine gesteigerte Anzahl an kometenförmiger DNA beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass MLH3 und MutL γ keine Funktion in der schadensvermittelten Zellzykluskontrolle tragen und dass die intrinsische Endonuklease von MLH3 keine *nicks* in die geschädigte DNA einführt.

Detektion persistierender DNA-Schäden durch Immunfärbung von γ H2AX

Eine Reproduktion der Ergebnisse der SCE wurde durch Detektion persistierender DNA-Schäden über Immunfärbung erreicht. Phosphoryliertes Histon H2AX (γ H2AX) ist ein häufig angewandter Marker für DNA-Doppelstrangbrüche und wurde bereits als Kennzeichen für G2/M-arretierte Zellen beschrieben (Stojic et al. 2004). DSBs entstehen in Folge von TMZ-Behandlung in der darauffolgenden Replikation. Da durch die Prozessierung der DNA-Schäden durch das MMR-System *nicks* in die fehlerhafte DNA eingeführt werden, entstehen Doppelstrangbrüche in Folge der Öffnung des DNA-Doppelstrangs bei der Bildung der Replikationsgabel.

Die Immunfärbung von γ H2AX führt zu fluoreszierenden Foci, welche softwaregestützt ausgezählt werden können. Kontrollen und Einzelklone wurden äquivalent zum vorangegangenen Experiment eingesetzt und mit TMZ behandelt. Abb.3.21 zeigt die

Ergebnisse der Auszählung von γ H2AX-Foci pro Zelle für die untersuchten Zelllinien und Einzelklone. Eine signifikant erhöhte γ H2AX-Foci-Formation nach Behandlung mit TMZ ist für die MMR-profiziente Zelllinie 293 sowie für mit MLH1/PMS2 rekonstituierte 293T-Zellen festzustellen. Parentale 293T-Zellen sowie MLH3- bzw. MLH1/MLH3-exprimierende Einzelklone zeigen lediglich γ H2AX-Foci auf Hintergrundniveau.

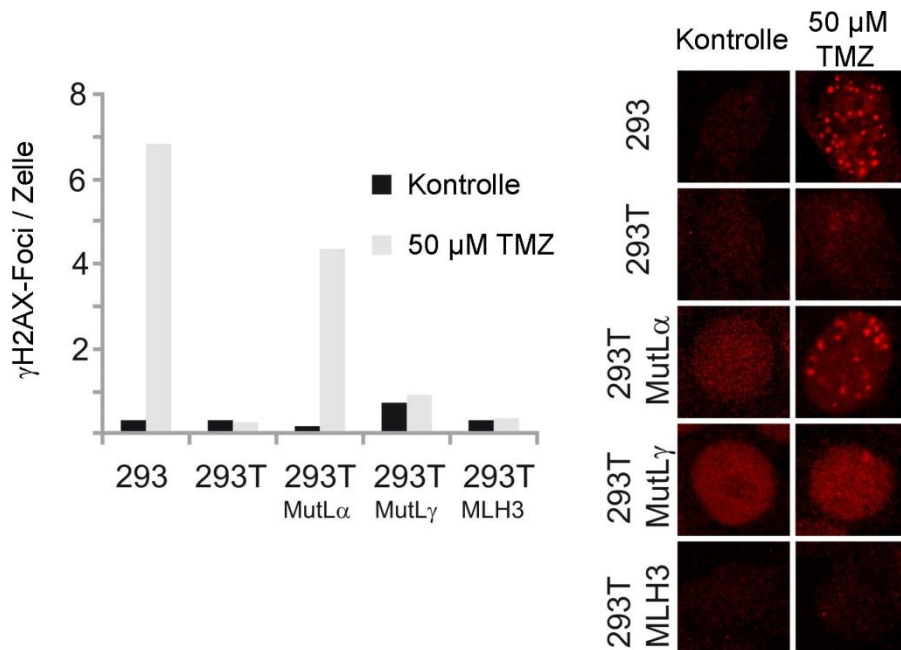


Abb.3.21 Immunnachweis von γ H2AX nach Temozolomid-Behandlung. Das Säulendiagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl von γ H2AX-Foci pro Zelle. Wie in Abb.3.20 repräsentieren graue Säulen Zellen nach TMZ-Behandlung und schwarze Säulen unbehandelte Kontrollen. Fluoreszenzaufnahmen einzelner Nuclei belegen beispielhaft das vermehrte Auftreten von γ H2AX-Foci in behandelten Zellen der Linie 293 sowie in 293T-Zellen nach Expression der Proteine des MutL α -Heterodimers. Je Zelllinie und Einzelklon wurden mindestens 50 Zellen analysiert. γ H2AX-Foci wurden mittels ImageJ (NIH, Bethesda, USA) quantifiziert.

Dieses Experiment unterstreicht deutlich, dass Doppelstrangbrüche in Folge von wiederholter Reparatur in Verbindung mit dem G2/M-Zellzyklusarrest entstehen. Dieser MutL α -abhängige Prozess kann weder durch MLH3 noch von MutL γ äquivalent durchgeführt werden.

Zusammenfassung der Experimente zur Auslösung des Zellzyklusarrests

Zusammenfassend kann eindeutig gezeigt werden, dass in Folge der Expression von MutL α in 293T-Zellen eine Rekonstitution des MMR-Systems stattfindet. Das Auslösen des MMR-abhängigen Zellzyklusarrests wird in diesen Zellen äquivalent zu MMR-profizienten Kontrollen über das Einschneiden der geschädigten DNA durch MutL α vermittelt.

Obwohl die Endonuklease-Domäne als Träger der Schlüssel-Funktion von MutL α auch in MutL γ vorhanden ist, besteht in menschlichen Zellen diesbezüglich keine Redundanz zu MutL α . In Folge von TMZ-Behandlung wird die geschädigte DNA durch MutL γ nicht eingeschnitten und der Zellzyklusarrest nicht ausgelöst.

Konklusiv ist eine Funktion von MutL γ in MMR auch in Abwesenheit von MutL α nicht nachweisbar.

4. Diskussion

Der zugrunde liegende Mechanismus der Korrektur von DNA-Fehlpaarungen durch die α/β -Heterodimere ist weitgehend aufgeklärt. Das vielfältige MMR System ist darüberhinaus an verschiedenen Funktionen der Zelle beteiligt, darunter der Zellzykluskontrolle, dem Auslösen von Apoptosesignalwegen, der Antikörperreifung sowie mitotischer und meiotischer DNA-Rekombination. Die MMR-Proteine MLH3, MSH4 und MSH5 tragen Funktionen in der chromosomalen Rekombination und sind im humanen System bisher weniger untersucht.

Die Expression dieser γ -Heterodimere ist in Mammaliazellen für verschiedene Phasen der Meiose beschrieben (Moens et al. 2001; Lipkin et al. 2002; Kolas et al. 2005 und Kan et al. 2008). Entgegengesetzt wurden für die α/β -Heterodimere neben der postreplikativen Reparatur in somatischen Zellen Funktionen während der Oogenese und Spermatogenese berichtet (Devouassoux-Shisheboran et al. 2001 und Velasco et al. 2004). Mit Beginn der Meiose werden diese jedoch herunterreguliert und liegen daher in Gameten nicht vor. Eine Zusammenfassung dieser Beobachtungen ist in einer Zeitleiste der verschiedenen Stadien der Entwicklung dargestellt (Abb.4.1).

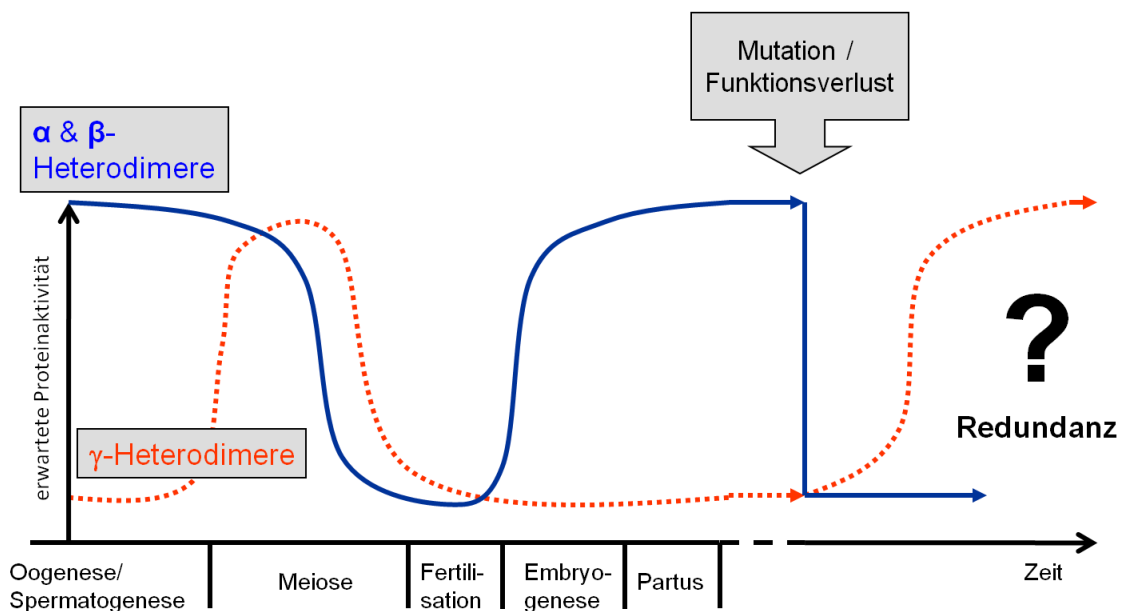


Abb.4.1 Expression von MMR-Proteinen zu Zeitpunkten der Entwicklung von Mammalia. Es werden zwei Gruppen unterschieden. Während die γ -Heterodimere (MutS γ , MutL γ) an der Meiose beteiligt sind, sichern die α/β -Heterodimere (MutS α , MutS β , MutL α) bei jeder Replikation die korrekte Duplikation der DNA. Entfällt diese Funktion der α/β -Heterodimere in somatischen Zellen, beispielsweise durch Mutation, könnte im Falle einer funktionalen Redundanz der Systeme auf die γ -Heterodimere ausgewichen werden. Expressionsdaten aus: Devouassoux-Shisheboran et al. 2001; Moens et al. 2001; Lipkin et al. 2002; Velasco et al. 2004; Kolas et al. 2005; Kan et al. 2008.

In somatischen Zellen erfolgt die Reparatur von Fehlpaarungen zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität während der Replikation und ist von größter Bedeutung für den Organismus. Ein Funktionsverlust des MMR-Systems, z. B. durch Mutation, führt zu einem Mutatorphänotyp der Zelle und kann in malignen Tumoren münden. Inwiefern die γ -Heterodimere durch redundante Funktion einen Ausfall der α/β -Heterodimere kompensieren und auf diese Weise eine Rolle in MMR spielen, soll unter Anderem Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sein.

Die Vermutung, dass MutL γ redundante Funktionen zu dem prominenten Schlüssel-Komplex MutL α aufweist, beruht dabei auf der Sequenzhomologie bezüglich der intrinsischen Endonuklease in PMS2 und MLH3 (Jiricny 2006) sowie Beobachtungen an Knockout-Mäusen (Chen et al. 2005, 2008). Putative redundante Funktionen von MutS γ zu MutS α und β sind aufgrund der Heterodimerisierung zu einer Klammer-Struktur, welche sich auf einem DNA-Strang bewegen kann, vorstellbar (Snowden et al. 2004). Obmolova et al. 2000 zeigten, dass durch die Dimerisierung zu MutS γ eine Klammer mit einem Loch des Durchmessers 30-70 Å entsteht. Diese Größe ist ausreichend, um nicht nur Doppelstrang-DNA oder Heteroduplex-DNA, sondern sogar komplexe Holliday-Strukturen zu umschließen (Snowden et al. 2004).

In dieser Arbeit soll ein Untersuchungssystem etabliert werden, an dem eine Redundanz der Proteine der γ -Heterodimere gegenüber den α/β -Heterodimeren hinsichtlich MMR überprüft werden kann.

4.1 Expression von MSH4 und MSH5

Nach der Entdeckung des humanen MSH4 im Jahre 1997 wurde berichtet, dass Expression lediglich in den Gonaden erfolgt (Paquis-Flucklinger et al. 1997). Später folgten Berichte über mehrere alternative Spleißvarianten in somatischem Gewebe, für die jedoch keine Funktion nachgewiesen werden konnte (Santucci-Darmanin et al. 1999). Die Entdeckung von humanem MSH5 wurde 1998/1999 parallel von drei unabhängigen Gruppen beschrieben (Her und Doggett 1998; Winand et al. 1998; Bocker et al. 1999). Expression wird primär in den Gonaden beschrieben, wobei im Gegensatz zu MSH4, Transkript auch in weiteren, wenn auch nicht allen Geweben detektiert werden kann (Winand et al. 1998; Bocker et al. 1999; Yi et al. 2005). Auch in B- und T-Zelllinien wurde MSH5 bereits nachgewiesen, darunter auch in den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien JURKAT und 293T (Bocker et al. 1999, Yi et al. 2005, Tompkins et al. 2009).

Äquivalent dazu konnte in der vorliegenden Arbeit MSH4-Transkription in somatischem Gewebe kaum nachgewiesen werden, was keinen Hinweis auf eine Backup-Funktion nach Ausfall anderer MMR-Proteine liefert. Auch die für verschiedene Gewebetypen und Zelllinien gezeigte Expression von MSH5 konnte durch die Analyse der Zelllinien in dieser Arbeit bestätigt werden. Dabei deutet die ubiquitäre Expression in MSS- und MSI-Linien nicht auf eine explizite Regulation in Folge eines MMR-Defekts hin, schließt sie aber auch nicht aus. Auch wenn die Expression nicht einwandfrei überprüft werden konnte, lässt die unterschiedliche Transkription von MSH4 und MSH5 darauf schließen, dass keine MutS γ -Heterodimere in somatischen Zellen vorliegen. Eine Komplementation eines MMR-Defekts durch MutS γ kann daher in den untersuchten Zelllinien nicht gezeigt werden.

4.2 Expression von MLH3

Mehrere Studien an Patienten mit der erblichen Form von Darmkrebs HNPCC wurden hinsichtlich der Frage durchgeführt, ob und inwiefern eine alleinige Defizienz von MLH3 zum Ausbruch der Krankheit geführt hat. In einem solchen Fall wäre für MutL γ eine MMR-Funktion anzunehmen und es würde ein konkurrierendes System zu MutL α darstellen. Unterschiedliche Ergebnisse der Studien führen bis heute zu einer kontroversen Diskussion.

In einer umfassende Studie von Wu et al. 2001 führte die Untersuchung von 39 Patienten aus 12 HNPCC-Familien sowie 288 Patienten mit Verdacht auf HNPCC zu der Entdeckung von 26 Sequenzvarianten und 10 möglichen Keimbahnmutationen, wobei ein milder MSI-Phänotyp mithilfe der Bethesda-Marker detektiert werden konnte. Andere Ergebnisse lieferte die Patientenstudie von Lipkin et al. 2001, in der keine Keimbahnmutationen des Gens, jedoch Mutationen in 25 % aller MSI-Tumore berichtet wurden. Auch Akiyama et al. 2001 und Liu et al. 2003 können keine Keimbahnmutationen von MLH3 als Auslöser für HNPCC detektieren. Entdeckte MLH3-Punktmutationen weisen darüberhinaus kein tumorigenes Potential auf (Loukola et al. 2000; Hienonen et al. 2003; de Jong et al. 2004).

Das häufige Auftreten von MLH3-Mutationen in MSI-Tumoren ist als Folge des Mutatorphänotyps denkbar. Mehrfach wurde berichtet, dass MMR-Gene sowohl cMSI auslösen als auch selbst Zielgene dieser sind. Neben Wachstumsregulatoren, apoptose- und zellzyklus-assoziierten Proteinen bilden Reparaturproteine eine weitere Gruppe von cMSI-Zielgenen. Für die in verschiedenen Reparaturmechanismen involvierten Gene RecQ1, ERCC5, DNAPK, BLM und BRCA2 sind erhöhte Mutationsraten in cMS bekannt (Calin et al. 1998; Mironov et al. 1999; Park et al. 2002). Auch MMR-Proteine selbst sind von Instabilität in codierenden MS betroffen. Malkhosyan et al. zeigten 1996 einen starken Effekt von MSI

auf MSH3 und MSH6, wonach Variabilität der repetitiven Sequenzen in bis zu 50 % aller HNPCC-Fälle und bis zu 39 % in sporadischen Tumoren mit MSI auftritt (Duval und Hamelin 2002). Da MLH3 auch codierende Mikrosatelliten aufweist, wurde eine Rolle in HNPCC auch über die Mutationen der insgesamt acht poly-Adenin-Wiederholungen überprüft. Die Arbeiten von Loukola et al. 2000 und Akiyama et al. 2001 zeigen jedoch Mutationsraten dieser cMS lediglich auf dem Level nicht-codierender MS.

Zusammengefasst argumentieren die Patientendaten gegen eine direkte Beteiligung von MutL γ in MMR und daher gegen ein konkurrierendes System zu MutL α . Ein komplementierendes System, in dem MLH3 in Folge einer MutL α -Defizienz den Ausfall kompensiert, ist jedoch nicht auszuschließen und bislang nicht untersucht worden.

In der Transkriptanalyse dieser Arbeit konnten vereinzelt MSI-Tumorzelllinien beschrieben werden, in denen MLH3-mRNA nicht oder nur unvollständig detektiert werden kann. Es ist nicht auszuschließen, dass dies eine Folge des Mutatorphänotyps darstellt. Passend zu einem komplementären System war in Zelllinien mit bekanntem Defekt des Proteins MLH1 Transkription von MLH3 in vollem Umfang nachweisbar. Die Transkriptionsanalyse der Zelllinien zeigt in diesem Fall eine leichte Tendenz hinsichtlich redundanter Systeme auf, liefert jedoch kein eindeutiges Ergebnis.

Eine Analyse der Translation in Tumorzelllinien konnte aufgrund qualitativ fehlerhafter Antikörper gegen die untersuchten Proteine nicht durchgeführt werden. Diese ist jedoch zur vollständigen Expressionsanalyse unabdingbar, da selbst vollständige Transkription keinen Nachweis für funktionelles Protein darstellt. Die Arbeitsgruppen von J. Jiricny, R. Fishel, S. Santucci-Darmanin und C. Her stellten in Ermangelung kommerziell erhältlicher Produkte funktionale Antikörper durch Immunisierung mit Peptiden von bis zu 646 Aminosäuren her (Bocker et al. 1999; Santucci-Darmanin et al. 2000, 2002; Yi et al. 2005 Cannavo et al. 2005, Charbonneau et al. 2009). Durch diese Arbeiten ist bekannt, dass auch MLH3 in verschiedenen humanen Zelllinien vorliegt und MutL γ -Heterodimere gebildet werden (in HeLa, Cannavo et al. 2005). Bezüglich der untereinander konkurrierenden Bindepartner von MLH1 liegt der hauptsächliche Partner, PMS2, etwa 10-mal häufiger als PMS1 (Räschle et al. 1999) und sogar 60-mal häufiger als MLH3 in der Zelle vor (Cannavo et al. 2005). Trotz funktionaler Antikörper behinderten schwache Expression und kurze Protein-Halbwertszeit eine Expressionsanalyse von MLH3 in humanen Gewebeproben (Hernandez-Pigeon et al. 2004; Charbonneau et al. 2009).

Nach Kontaktierung der Arbeitsgruppe von J. Jiricny (Universität Zürich, Schweiz) wurde für die vorliegende Arbeit Serum eines entsprechend immunisierten Kaninchens bereitgestellt.

Der direkte Einsatz des Serums in einer Western Blot Analyse von Zelllysaten führte jedoch wiederum nicht zur Detektion von MLH3. Zum erfolgreichen Einsatz hätte wahrscheinlich eine Aufreinigung des Serums erfolgen müssen, was jedoch hinsichtlich eines Zelllinienscreenings zu keiner ausreichenden Menge geführt hätte.

Um diese Probleme zu umgehen, sollte ein rekombinantes System generiert werden, an dem Experimente zur Untersuchung von Reparaturfunktionen durchgeführt werden können.

4.3 Stabile Expression als Werkzeug zur Untersuchung von Reparaturfunktionen

Während transiente Expression in menschlichen Zellen kürzlich berichtet wurde (Ou et al. 2009), ist eine stabile Expression von WT-MLH3 oder Deletionsmutanten als toxisch in humanen Zellen beschrieben (Lipkin et al. 2000, Charbonneau et al. 2009). Diese Beobachtung wurde als mögliche Ursache für die geringen Mengen an endogenem Protein beschrieben (Cannavo et al. 2005). Expression von MLH1 konnte über das Einbringen eines zusätzlichen, intakten Chromosoms in die MLH1-defiziente Zelllinie HCT-116 oder über induzierbare Promotoren erreicht werden, wodurch die Toxizität umgangen werden konnte (Cejka et al. 2003; Stojic et al. 2004). Stabile Expression weiterer Gene der MutL-Familie in humanen Zellen ist bisher nicht bekannt.

Diese Arbeit berichtet erstmals die stabile Expression von rekombinantem MLH3 in humanen Zellen. Der Erfolg beruht dabei auf der Expression in multicistronischen Vektorsystemen und der damit verbundenen Transkription der gesamten Expressionskassette auf einer mRNA. Diese Kopplung des selektiven Markers an das jeweilige MMR-Gen stellt die Transkription weitestgehend sicher. Bei der Etablierung von stabil exprimierenden Einzelklonen spiegelte sich die beschriebene Toxizität der Proteine jedoch deutlich in einer reduzierten Effizienz der Transfektion wider. Weiterhin lässt das schwache Expressionsniveau von rekombinantem MLH3 vermuten, dass eine Selektion gegen stark exprimierende Einzelklone stattfindet. Vermutlich führt die Toxizität der Proteine zum Zelltod, sobald ein physiologisch tolerierbare Schwellenwert überschritten wird.

Insbesondere die konstitutive Expression in den isogenen Zelllinien 293 und 293T ermöglichte eine biologische Untersuchung von MMR. Da 293T-Zellen keine Expression MutL-homologer Proteine aufweisen, ist nach einer Rekonstitution einzelner Proteine ein Vergleich dieser möglich. Durch das 293/293T-System können einzelne MutL-homologe Proteine in An- und Abwesenheit der Bindepartner verglichen und Versuche durchgeführt werden, die Aussagen über enzymatische Aktivität der intrinsischen Endonuklease und damit über MMR erlauben.

4.4 Überprüfung rekombinanter Proteine

Eine Proteinexpression in Fusion mit Fluoreszenzgenen kann unter Umständen Funktion und Struktur des Proteins von Interesse maßgeblich beeinflussen oder sogar zerstören. Daher sind weitreichende Funktionstests der rekombinanten Proteine notwendig. Parameter einer korrekten Expression sind entsprechende Lokalisation in der Zelle, Stabilität sowie Interaktion mit bekannten Partnern. Im Falle einer Beeinträchtigung dieser Parameter in Folge der Fusion, wird die Markierung häufig an das entgegengesetzte Ende des Proteins fusioniert oder Platzhalter-Aminosäuren als Verbindung (*linker*) eingefügt (Dundr und Misteli 2003).

4.4.1 Protein-Protein-Interaktionen und Lokalisation

Für die Proteine der Heterodimere MutL α und MutL β stellt die Überprüfung der Lokalisation zugleich auch einen funktionalen Nachweis dar, da nukleäre Lokalisation nur über korrektes Bindeverhalten erfolgt. Diese Beobachtungen, die zuerst in Maus gemacht (Wu et al. 2003) und später im humanen System bestätigt wurden (Brieger et al. 2005), werden auf bipartite nukleäre Lokalisationssignale zurückgeführt. Online-Werkzeuge zur Sequenz-Analyse können aufgrund konservierter Motive NLS und NES (nukleäre Exportsignale) erkennen (Tab.4.1).

Tab.4.1 Vorhersage putativer NLS und NES der MutL-homologer Proteine und MutSy. Peptidsequenzen, die durch die Algorithmen der Programme PSORTII und NetNES (<http://bioweb2.pasteur.fr/docs/psort/>) erkannt wurden, sind den entsprechenden Genen zugeordnet.

Gen	NLS	NES
MLH1	RKRHR PRRRIIN	PLFDLAMLALD YVPPLEGLPIF PLEGLPIFILR
PMS2	KRIK RKFR PNTKRFK	EMEIGQFNLG FIITKLNEDIFIV VNEAVLIENLEIF
PMS1	RPRK KRAIEQESQMSLKDGRK	
MLH3	RRHR KHKK PVRKCM PKRFKDA PIVRKKL RRKCMDPRLEFEKVRQR RKTDKLIGFSKPIVRKK KKLSLSSQLGSLEKFKR	MTLKELSL
MSH4		LIYLKHTLEL LCHIDALYP LKISLPLEI
MSH5	KKRR	LVDKTMKLDL

Lokalisation von MutL α und MutL β

In den Dimeren MutL α und MutL β treten sowohl monopartite als auch bipartite NLS auf. Wie einleitend erwähnt, führt Heterodimerisierung zu einer Demaskierung von NLS auf beiden Proteinpartnern des Dimers, welche in Kombination zur Kernlokalisierung führen. Die NES tragen in MLH1 und PMS2 nicht zur Regulation bei (Wu et al. 2003). Die nukleäre Lokalisation von MLH1, PMS2 und PMS1 bestätigt daher korrekte Bindekapazitäten der rekombinanten Proteine.

Lokalisation von MutS γ

Für die Proteine des MutS γ -Dimers werden hingegen in erster Linie NES-Motive durch die Software erkannt. Insbesondere wird im Fall von MSH4 deutlich, dass eine Regulation der Lokalisation durch Nucleus-Export aufgrund von drei NES wahrscheinlich ist. Bestätigt wurde diese Theorie durch Neyton et al. 2007, die eine Lokalisation transient exprimierter MSH4- und MSH5-Proteine im Nucleus nach Hemmung des Exportins CRM1 erreichen konnten. Da in murinen testikulären Zellen eine Lokalisation sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus zu beobachten ist, kann auf eine unterschiedliche Regulation der Zugänglichkeit von MutS γ zur DNA durch nukleären Import/Export in somatischen und meiotischen Zellen geschlossen werden.

Die in dieser Arbeit beobachtete Fluoreszenz im Cytoplasma der rekombinanten Zellen für MutS γ ist demnach auf aktiven Export zurückzuführen und als Bestätigung korrekter Expression zu interpretieren. Da die Untersuchung von Funktionen in der DNA-Reparatur jedoch eine Lokalisation im Nucleus voraussetzt, wurden die MutS γ -exprimierenden Zellen in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Lokalisation und Protein-Protein-Interaktionen von MutL γ

Interessanterweise weist die Aminosäuresequenz von MLH3 acht putative NLS auf. Die beobachtete Lokalisation im Nucleus zeigte eine Sonderstellung von MLH3 in Bezug auf diese Eigenschaft. Aus der Zelllinie HCT-116, die einen Defekt für MLH1 aufweist, ist bekannt, dass MLH3, im Gegensatz zu PMS2 und PMS1, auch ohne den Dimerisierungspartner stabil in humanen Zellen vorliegen kann (Cannavo et al. 2005). Diese Beobachtung wird durch die nukleäre Lokalisation in Abwesenheit des Bindepartners erweitert und bestätigt Ergebnisse aus transienter Expression in 293T (Ou et al. 2009).

Die Co-Expression der MutL γ -Proteine zeigt darüberhinaus, dass MLH1 nach Bindung von MLH3 im Kern lokalisiert ist. Dieser neuen Erkenntnis können zwei Ursachen zugrunde liegen. Entweder reichen die zahlreichen NLS des Proteins MLH3 aus, um den dimerisierten Komplex in den Kern zu importieren, oder die Bindung von MLH3 demaskiert vergleichbar mit PMS2 die NLS von MLH1. Um dies näher zu untersuchen, müssten Deletionsmutanten der MLH1-NLS eingesetzt werden.

Weiterhin wurden Bindungseigenschaften des rekombinanten MLH3-Proteins über Affinitätschromatographie und Co-IP untersucht. Die Heterodimerisierung von MutL γ konnte über die Dimerisierung von GFP-MLH3 mit endogenem und darüberhinaus mit rekombinantem MLH1 gezeigt werden. Obwohl in Co-IP-Experimenten mit *in vitro*-translatierten Proteinen eine Bindung zwischen MLH3 und MSH3 gezeigt wurde (Charbonneau et al. 2009), konnte diese in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Beobachtung, dass MLH3 und MSH3 in murinen Zellen während der Meiose an den Zentromeren der Chromosomen co-lokalisiert sind (Kolas et al. 2005), lässt den Schluss zu, dass diese Proteinbindung lediglich in meiotischen Zellen auftritt.

4.4.2 Protein-Interaktionen mit nukleären Strukturen

Die Bindung von MLH3 an zelluläre Strukturen des Nucleus wurde mittels FRAP und konfokaler Mikroskopie analysiert (s. 2.6.2). Techniken, die über das Ausbleichen von fluoreszierenden Proteinen Aussagen über diese erlauben, werden als *Photobleaching*-Techniken bezeichnet. Es handelt sich dabei um Experimente unter physiologischen Bedingungen (s. 2.6.3) mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung, die Aufschluss über Motilitäten und Interaktionen von Proteinen in spezifischen Teilen der Zelle geben können (Dundr und Misteli 2003). Die Verwendung von GFP zum Verfolgen von Proteinen ist aufgrund der Stabilität des Signals sowie der Irreversibilität des Ausbleichens vorteilhaft. Desweiteren führt das Ausbleichen von GFP zu keinem detektierbaren Schaden in der Zelle, was vermutlich auf die käfigartige Struktur des Proteins zurückzuführen ist, welche das kleine Fluorophor-Peptid umschließt (Dundr und Misteli 2003; Snapp et al. 2003). Durch diese Techniken konnte mehrfach demonstriert werden, dass die Mehrheit aller nukleären Proteine mobil im Zellkern vorliegt und nicht durch Substrukturen des Kerns gebunden oder separiert ist. Vielmehr existiert eine stetige, energieunabhängige Mobilität im umgebenden Nucleoplasma, sowie ein schneller Austausch an Bindestellen (Phair and Misteli 2000; Beaudouin et al. 2006). Diese Art von Motilität, wie sie auch für MLH3 in dieser Arbeit zu

beobachten ist, wird auch als simple Diffusion, in Abgrenzung zu eingeschränkter Diffusion bezeichnet (Verkman 2002).

4.5 MLH3 in der Mitose

Durch konfokale Mikroskopie konnte während der Mitose eine Co-Lokalisation von stabil exprimiertem MLH3 und γ -Tubulin an den Centrosomen gezeigt werden. Centrosomen sind kleine Organellen von etwa 1 μm Durchmesser, die je ein Paar zylindrischer Mikrotubuli-Strukturen, die Centriolen, enthalten. Jede Zelle trägt ein Centrosom, welches parallel zur Replikation des Genoms dupliziert wird. Zu den bekannten Funktionen in der Zelle gehören die Organisation des Mikrotubuli-Netzwerks durch den Zellzyklus hindurch und insbesondere die Formation des Spindelapparats während der Meiose. Zusätzliche Kopien (*supernumerary centrosomes*) führen oft zu defekter Mitose aufgrund multipolarer Spindeln und wurden für fast alle Arten von Krebs beschrieben (Nigg 2002). Die Regulation der Centrosomen-Anzahl erfolgt vermutlich über mehrere Zellzyklus-Kontrollpunkte (*spindle assembly checkpoint*, Kwon et al. 2008) in denen ein Arrest durch Reparaturproteine ausgelöst werden kann. Bisher wurden neben einer Vielzahl nicht-Reparatur-assoziiierter Proteine insbesondere solche detektiert, die in HR und NHEJ involviert sind. Defekte in diesen Reparaturproteinen führen zu einer mehrfachen Verdoppelung der Centrosomen innerhalb eines Zellzyklus. (Shimada und Komatsu 2009). Campbell et al. berichteten 2006 auch für $\text{Msh2}^{-/-}$ -Knockout-Mäuse eine erhöhte Anzahl von Centrosomen in einem Drittel aller Zellen sowie Veränderungen an den Telomeren. Die Lokalisation von MSH2 an den Centrosomen wurde daraufhin von Narine et al. 2010 nachgewiesen. Eine weitere Verknüpfung zum MMR-System besteht in der Bindung von MSH4 an das in der Mikrotubuli-Synthese beteiligte Protein VBP1 (van-Hippel-Lindau binding protein 1, Geissler et al. 1998; Her et al. 2003).

Die Verbindung zwischen den Centrosomen und DNA-Reparatur besteht also in der Kontrolle der Centrosomen-Anzahl. Nach MSH2 konnte in dieser Arbeit auch MLH3 an Centrosomen assoziiert nachgewiesen werden. Die Bindung könnte über MSH4 und VBP1 erfolgen.

4.6 Antwort auf induzierte DNA-Schäden (DDR)

UVA-Laser induzierte DNA-Schäden bieten die Möglichkeit, mit hoher örtlicher und zeitlicher Genauigkeit zelluläre Folgeprozesse in lebenden Zellen zu beobachten. Die genotoxischen Effekte von UVA sind hauptsächlich auf die Entstehung von oxidativem Stress und ROS zurückzuführen. Die häufigsten Schäden nach UVA-Bestrahlung sind Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD), 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4PP), oxidierte Purine,

oxidierte Pyrimidine sowie Einzelstrangbrüche der DNA (Douki et al. 2003; Batista et al. 2009). Lan et al. 2004 erzeugten darüberhinaus mit einem UVA-Laser auch DSBs in lebenden Zellen. Diese DNA-Schäden sind bekannte Substrate für die Reparaturmechanismen NER, BER, HR und NHEJ. Die Akkumulation der entsprechenden Proteine am Ort induzierten DNA-Schadens wurde schon für mehrfach gezeigt (Lan et al. 2004).

Weiterhin ist bekannt, dass auch Proteine der MMR nach UV-induziertem DNA-Schaden akkumulieren. Die Dissertation von A. Siebert zeigte 2007 die Anreicherung von MutS α und MutS β am Ort des Schadens, wobei über alternativ gespleißte Varianten eine Abhängigkeit von PCNA klar gezeigt werden konnte. Analog dazu berichteten Hong et al. 2008 die Akkumulation der transient exprimierten MMR-Proteine MSH2, MSH3, MSH6 und MLH1, was auch durch Immunfärbung endogener MMR-Proteine reproduziert werden konnte. Während Siebert die Persistenz der Akkumulation für 30 min beschrieb, erfolgte diese bei Hong et al. über eine Stunde, was jedoch auf Unterschiede der eingesetzten Laser und deren Intensität zurückgeführt werden kann. Aufgrund der Beobachtung, dass die Akkumulation der Heterodimere MutS α/β die Anwesenheit von PCNA erfordert und die MLH1-Akkumulation gebundenes MutS α/β benötigt, vermuteten Hong et al. eine schrittweise Rekrutierung der Proteinkomplexe.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente erweitern diese Beobachtungen um die verschiedenen Proteine der MutL-Heterodimere. Darunter wurden sowohl Proteine eingesetzt, deren Funktionalität in MMR nachgewiesen ist, als auch Proteine, Spleißvarianten und Deletionsmutanten, für die keine aktive Reparaturfunktion zu erwarten ist.

4.6.1 Akkumulation von MutL α , MutL β und MutL γ am Ort induzierten DNA-Schadens

Passend zu den berichteten Daten über MutS-Heterodimere am Ort des Schadens, erfolgt die Akkumulation der drei bekannten MutL-Heterodimere binnen weniger als einer Minute. Die aufgezeichnete Akkumulationskinetik für MLH3 zeigte hohe Ähnlichkeit zu den berichteten Daten für MSH-Proteine und MLH1, da Fluoreszenzfoci binnen Sekunden detektiert werden konnten und über 30 min hinweg am Ort des Schadens zu erkennen waren.

4.6.2 Akkumulation von MLH3

Die Unerheblichkeit der An- oder Abwesenheit von MLH1 bezüglich der DDR von MLH3 ist ein überraschendes Ergebnis. Die von Hong et al. postulierte schrittweise Rekrutierung der α/β -Heterodimere kann bezüglich MLH3 nicht angewandt werden, da eine Bindung an die MutS-Komplexe nur über MLH1 vorstellbar ist (s. 3.3.1). Inwiefern PMS2 und PMS1

ebenfalls zu einer MLH1-unvermittelten Anreicherung fähig sind, kann nicht untersucht werden, da ohne MLH1 die Lokalisation im Nucleus nicht gegeben ist.

Zur Untersuchung der Dynamik der akkumulierten MLH3-Moleküle wurde ein FRAP-Experiment durchgeführt. In vergleichbaren Experimenten konnte für die BER-Proteine XRCC1 und Ligase3 sowie Ligase1 und RPA eine hohe Dynamik und Fluoreszenzwiederherstellung zu 100 % gemessen werden (Mortusewicz und Leonhardt 2007, 2008). Im Gegensatz dazu zeigen die Reparaturenzyme XRCC4 und Ligase4 des NHEJ-Reparaturwegs 20 % Persistenz am Ort des Schadens (persönliche Mitteilung C. Mielke). Für PCNA, das in einer Vielzahl von Reparaturmechanismen maßgeblich involviert ist, wurde eine Persistenz von 30 % aller Moleküle am Ort des Schadens nachgewiesen (Mortusewicz und Leonhardt 2007).

Die in dieser Arbeit gemessene Persistenz von 20 % aller MLH3-Moleküle am Ort der DNA-Läsion zeigt verglichen mit der hohen Dynamik und Motilität, die das Protein ohne induzierten Schaden aufweist, eine deutlich eingeschränkte Diffusion. Vergleichbare Daten anderer Reparaturproteine argumentieren für eine schadensspezifische Akkumulation.

4.6.3 Akkumulation von Deletionsmutanten und Varianten von MLH3

In dieser Arbeit sollte durch die Verwendung verschiedener Spleißvarianten und Deletionsmutanten des Proteins MLH3 überprüft werden, ob die Bindung an DNA-Läsionen auf konservierte Domänen zurückzuführen ist. Konsistent zur Foci-Formation von MLH3 in Abwesenheit von MLH1 konnte Akkumulation der um die MLH1-Bindedomäne verkürzten Deletionsmutante am Ort des Schadens beobachtet werden. Diese C-terminal verkürzte Mutante bestätigt daher die Unabhängigkeit von MLH3 und MLH1.

Zwei weitere mutierte MLH3-Versionen zeigten darüberhinaus deutliche Akkumulation am Ort der Schadens unabhängig von der ATPase-Funktion des Proteins. Aktuelle Arbeiten von Johnson et al. (2010) zeigen jedoch eine geringe Bedeutung der ATPase-Motive der MLH1-Bindepartner durch die Beobachtung, dass in der MMR lediglich die ATPase-Domäne des Proteins MLH1 funktional ist.

Weiterhin ist die Foci-Formation an DNA-Läsionen unabhängig von der Endonuklease-Domäne, da auch in Abwesenheit dieser die Akkumulation erfolgt. Dem MLH1-Bindepartner PMS1 wird aufgrund der fehlenden Endonuklease-Domäne keine Reparaturfunktion, sondern eine negative Regulation der MutL α -Aktivität zugeschrieben (Cannavo et al. 2007). Äquivalent kann bis auf Weiteres lediglich eine regulatorische Funktion für die berichteten

MLH3-Spleißvarianten in der Antwort auf UV-vermittelte DNA-Schäden angenommen werden.

Der N-Terminus des MLH3-Proteins ist essentiell für die Akkumulation am Ort des Schadens. Gegen eine Fehlfaltung des Proteins aufgrund der gezielten Deletion spricht, dass eine Fusion des N-Terminus mit GFP ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die Faltung zeigt. Ein Nachweis der Proteinintegrität der Deletionsmutante könnte weiterhin über Co-Immunpräzipitation mit MLH1 erfolgen. Abb.4.2 zeigt den deletierten N-terminalen Bereich von MLH3, welcher in der Deletionsmutante nicht vorhanden ist, im Sequenzabgleich mit weiteren MMR-Proteinen.

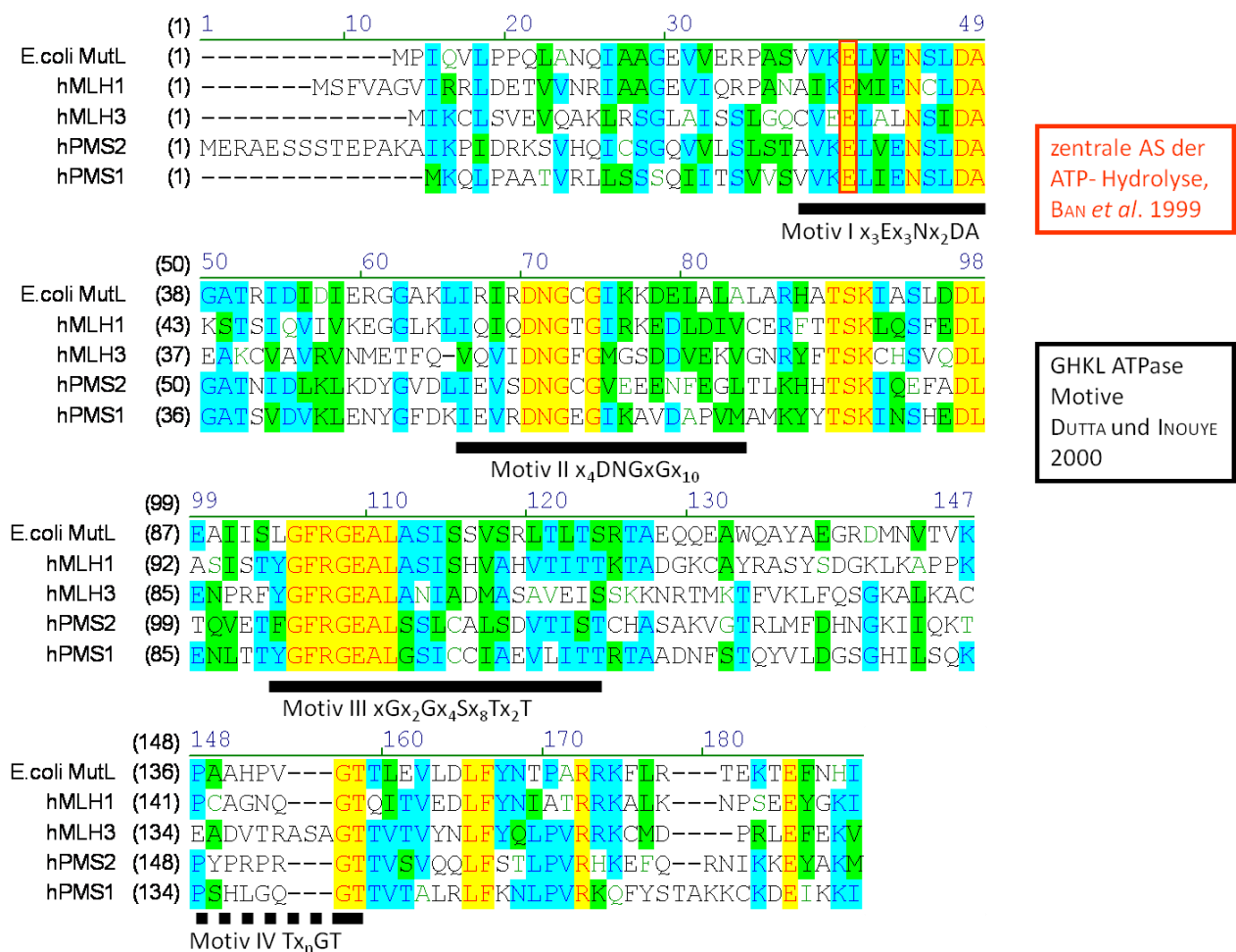


Abb.4.2 Sequenzabgleich der N-terminalen Bereiche von MutL-homologen Proteinen. Die dargestellte Aminosäuresequenz entspricht dem deletierten Bereich der Deletionsmutante MLH3del.N. Die durch 4 Motive gekennzeichnete, hoch konservierte ATPase-Domäne gruppiert die Proteine Topoisomerase II, Chaperon Hsp90, bakterielle Gyrase sowie Histidinkinasen in der GHKL-Superfamilie (Gyrase, Hsp90, Histidinkinase, MutL, Dutta und INOUE 2000). Im humanen MMR-System ist eine derartige ATPase-Domäne in allen MutL-Homologen, nämlich MLH1, PMS2, PMS1 und MLH3 nachweisbar. Als zentrale Aminosäure (AS) ist die Glutaminsäure an Position 28 (hMLH3) bzw. 29 (*E.coli*) beschrieben (Ban et al. 1999).

4.6.4 Schlussfolgerung der DDR

Hong et al. diskutierten 2008 eine Rolle von MMR in NHEJ, da aufgrund der langen Persistenz am Ort des Schadens von Doppelstrangbruchreparatur ausgegangen wurde. Siebert diskutiert die Akkumulation von MutS α und MutS β als MMR-Funktion in Folge fehlerhafter Reparatur durch Transläsionspolymerasen des BER- und NER-Reparaturwegs und postuliert ein Cleaning-up-System durch MMR während des gesamten Zellzyklus.

Für MutL-homologe Proteine kann jedoch allein aufgrund von Foci-Formation kein direkter Rückschluss auf aktive MMR gezogen werden, da verschiedene Deletionsmutanten bzw. Spleißvarianten in Folge des UVA-vermittelten Schadens akkumulieren. Die Expression von vermutlich regulativ wirkenden MutL-homologen Proteinen wie PMS1 und MLH3 Δ 7 ist jedoch in humanen Zellen verglichen mit PMS2 in einem geringen Umfang zu erwarten (s. 4.2). Da die Akkumulation ebenfalls nicht durch den Zellzyklus der Zelle reguliert ist, kann mit diesem Experiment eine allgemeine Reaktion der MutL-Heterodimere auf DNA-Schäden gezeigt, jedoch keine MMR-Funktion untersucht werden.

MLH3 könnte in diesem Repairosom direkt an geschädigte DNA oder an weitere Proteine gebunden sein, was vermutlich über den N-Terminus von MLH3 erfolgt. Um gebundene DNA-Sequenzen zu identifizieren, könnte eine Chromatin-IP durch Präzipitation von MLH3 nach Induktion von DNA-Schaden erfolgen.

4.6.5 Partnerproteine von MLH3

Die MLH3-Akkumulation unabhängig von MLH1 lässt auf drei mögliche Formen schließen, in denen MLH3 rekrutiert werden könnte: das Monomer, das Heterodimer und das Homodimer.

Die Homologie zu PMS2 kann als Hinweis darauf gesehen werden, dass MLH3 an DNA-Läsionen in Form eines Monomers binden könnte. Eine Affinität von PMS2 zu dsDNA, konnte *in vitro* auch in Abwesenheit von MLH1 nachgewiesen werden (Guarné et al. 2001). In Folge unspezifischer Affinität zu dsDNA würde man allerdings auch ohne induzierten DNA-Schaden eine Bindung gleicher Intensität erwarten. Diese wurden durch FRAP sowie Beobachtungen während der S-Phase ausgeschlossen.

Da in Mammaliazellen bisher für alle MMR-Moleküle eine Heterodimerisierung nachgewiesen wurde, könnte man für einen weiteren, bisher nicht identifizierten Partner argumentieren. Allerdings wurden für MLH3 in Maus bereits mehrere Funktionen in Unabhängigkeit von MLH1 nachgewiesen. Kolas et al. zeigten 2005 eine Assoziation eines Proteinkomplexes bestehend aus MLH3, MSH3 und MSH2 an repetetive Sequenzen der

Centromere. Auch bindet MLH3 während der Meiose in murinen Zellen zunächst ohne Beteiligung von MLH1 an Holliday-Strukturen, woraufhin MLH1 rekrutiert wird. In Folge dessen wurde die Homodimerisierung von MLH3 schon mehrfach vermutet (Lipkin et al. 2002; Kolas und Cohen 2004).

Die Existenz von MLH3-MLH3-Dimeren wurde mittels Co-IP überprüft. Die Expression zweier unterschiedlich fluoreszenzfusionierter Proteine ermöglichte den Nachweis gegenseitig gebundener MLH3-Moleküle. Da die Toleranz gegenüber rekombinantem MLH3 in humanen Zellen wie berichtet sehr gering ist, führte die tricistronische Expression zu einer entsprechend verminderten Expression der unterschiedlich fusionierten MLH3-Versionen. Im Fall von etwa gleichen Expressionsverhältnissen tritt die Homodimerisierung eines GFP- und eines TagRFP-fusionierten Moleküls in der Zelle mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % auf. Während in einem Kontrollexperiment die Heterodimerisierung von MutL γ bestätigt werden konnte, wurden durch den Einsatz von TagRFP-MLH3 als Köder für GFP-MLH3 in den Zellen vorhandene MLH3-Homodimere nachgewiesen.

Dass der Nachweis der Homodimerisierung vice versa nicht reproduziert werden konnte, kann quantitative oder qualitative Ursachen haben. Da TagRFP-MLH3 im Ausgangslysat verhältnismäßig schwächer detektiert werden konnte, resultiert eine leicht verschobene Wahrscheinlichkeit zu Gunsten der Bildung von GFP-MLH3-Homodimeren. Weiterhin ist denkbar, dass die TagRFP-MLH3-Fusion zu einer Maskierung der nativen TagRFP-Epitope führt. In einem solchen Fall detektiert der TagRFP-Antikörper die entsprechenden Epitope erst nach Denaturierung im Western Blot, jedoch nicht in der Co-IP. Dass eine derartige Maskierung nicht für TagRFP-MLH1 in der Kontrollreaktion zu beobachten ist, könnte auf den deutlichen Größenunterschied von MLH1 und MLH3 zurückgeführt werden. Von der Existenz von MLH3-Homodimeren in der Zelle kann daher ausgegangen werden. Alternative Protein-Interaktions-Assays wie Y2H könnten zur Bestätigung dieser Ergebnisse angewandt werden.

4.7 Beteiligung an MMR

Erkenntnisse über die Funktionen von MLH3 in der MMR eukaryotischer Zellen sind im Wesentlichen auf Experimente an Maus- und Hefezellen zurückzuführen. Da in Hefe jedoch mehrere Unterschiede in den MMR-Proteinen und entsprechenden –Dimeren bekannt sind, ist primär das murine System als Modellsystem für humane MMR von Bedeutung.

Zellen von Mlh3^{-/-}-Knockout-Mäusen zeigen ein deutlich erhöhtes Auftreten von Leserahmenverschiebungen und IDL-Strukturen und belegen auf diese Weise eine Funktion

von Mlh3 in MMR. Dies spiegelt sich auch in der Krebsanfälligkeit von Knockout-Mäusen wider. Während für defektes Mlh1 eine um die Hälfte verkürzte Lebenserwartung durch die Entwicklung von Tumoren berichtet wird, zeigen Ausfälle von Pms2 oder Mlh3 mildere Auswirkungen. Mlh3^{-/-}Pms2^{-/-}-Mäuse zeigen dagegen zu Mlh1^{-/-} äquivalent verkürzte Lebensspannen, was für eine funktionelle Redundanz dieser MLH1-Bindepartner spricht (Chen et al. 2005). Dieses System ist jedoch nicht auf den Mensch übertragbar, da wie einleitend erwähnt, keine Keimbahnmutationen für MLH3 bekannt sind, die ein erhöhtes Krebsrisiko mit sich bringen. Dennoch könnten über die MutL-Proteine konservierte MMR-Funktionen vorhanden sein.

Da die nukleäre Verteilung von MLH3 während der S-Phase keinen Hinweis auf Beteiligung an postreplikativer MMR geben konnte, müssen hoch spezifische Assays eingesetzt werden, um eine Beteiligung an humaner MMR zu untersuchen.

Zur Untersuchung der endonukleolytischen Inzision durch das MutL α -Heterodimer wurden zahlreiche Studien anhand von Heteroduplex-Plasmid-DNA durchgeführt (Kadyrov et al. 2006). Dazu werden in einem komplizierten Verfahren zwei einzelsträngige DNA-Plasmide, welche sich in einer oder wenigen Basen unterscheiden, hybridisiert. Durch Verdau des einen Plasmids durch ExonukleaseIII entsteht einzelsträngige, ringförmige DNA, die mit linearisierter, denaturierter DNA des zweiten Plasmids hybridisiert wird. Die Reparatur der Fehlpaarung durch aufgereinigte Proteine erfolgt anschließend *in vitro* (Genschel und Modrich 2003; Dzantiev et al. 2004; Bärenfaller et al. 2006; Zhou et al. 2009).

Die stabile Expression und damit verbundene Rekonstitution der Zelllinie 293T mit unterschiedlichen MutL-homologen Proteinen ermöglicht im Gegensatz dazu ein Experiment, in dem der endonukleolytische Schnitt *in vivo* untersucht werden kann. Ausgehend von der Beobachtung, dass ein intaktes MMR-System zur Auslösung eines G2/M-Zellzyklusarrests in Folge einer Behandlung mit alkylierenden Agenzien benötigt wird (York und Modrich 2006), wurde die Auslösung des Arrests in den 293T-Einzelklonen untersucht.

Der Einsatz S_N1-alkylierender Agenzien wie MNNG oder TMZ führt zur Alkylierung von Stickstoff- und Sauerstoffatomen von DNA-Basen. Hauptsächlich treten N⁷-Methylguanin und N³-Methyladenin auf (Sedgwick und Lindahl 2002), die sehr effizient durch die Enzyme des BER-Mechanismus repariert werden. Die Toxizität wird jedoch O⁶-Methylguanin zugeschrieben (Stojic et al. 2004). Damit in den durchgeführten Experimenten die Mehrheit dieser Methylierungen nicht über direkte Reparatur via MGMT (vgl. 1.2) revidiert wird, muss Letztere blockiert werden. Dazu wird O⁶-Benzylguanin eingesetzt, was als alternatives

Substrat für die MGMT dient und auch in der Krebstherapie eingesetzt wird, um die Effizienz alkylierender Agenzien zu erhöhen (Stojic et al. 2004). Die spezifische Abhängigkeit des G2/M-Zellzyklusarrests von einem intakten MMR-System ist weiterhin nur gegeben, wenn geringe Dosen alkylierender Agenzien eingesetzt werden (z.B. 0,2µM MNNG, Stojic et al. 2005). Die Zelle durchläuft daraufhin den Zellzyklus und nach der Replikation entstehen O6^{meG}/T-Fehlpaarungen, die spezifisch durch das MMR-System erkannt werden (s. 1.3.4, Berardini et al. 2000; Yoshioka et al. 2006). Da die Erkennung durch das MMR-System post-replikativ stattfindet (Mojaš et al. 2007) und auf dem Einschneiden fehlerhafter DNA beruht, ist der Prozess äquivalent zur Mismatch-Reparatur von Polymerasefehlern.

Die durchgeführten Experimente SCE und γH2AX-Färbung nach TMZ-Behandlung liefern zu zwei Zeitpunkten Einblick in die Signalkaskade von der DNA-Alkylierung zum Zellzyklusarrest. Die in der SCE sichtbaren Fragmente sind auf *nicks* in der DNA zurückzuführen, die durch MMR bei der wiederholten Prozessierung von O6^{meG}/T-Fehlpaarungen entstehen.

Die γH2AX-Foci zeigen Doppelstrangbrüche, die in Folge der *nicks* in Kombination mit replikativer Strangentwindung und dem Kollaps der Replikationsgabeln entstehen (Mojaš et al. 2007). Der MRN-Komplex, der die freien Enden der Doppelstrangbrüche während der Replikation bindet, aktiviert daraufhin ATM und hält die Signalkaskade in Richtung Apoptose aufrecht (Mirzoeva et al. 2006; Misteli und Soutoglou et al. 2009). Die Beobachtungen dieser Experimente sind konsistent mit dem Modell des *futile cycling* zur Auslösung des Zellzyklusarrests. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in einzelnen Zellen ein direktes Signal zur Aktivierung von ATM/ATR führt, jedoch ist aufgrund der Tatsache, dass der Arrest erst während der 2. Zellteilung auftritt, für die Mehrheit der Zellen ein Prozessieren des Schadens ausschlaggebend (Stojic et al. 2005).

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass der G2/M-Zellzyklusarrest in 293T-Zellen nach Expression des MutLα-Heterodimers, nicht jedoch des MutLγ-Heterodimers oder MLH3, ausgelöst werden kann. Schlussfolgernd kann ein gravierender Unterschied zwischen dem humanen und dem murinen MMR-System festgestellt werden. Neben den oben genannten Reparaturdefiziten von Mlh3^{-/-}-Knockout-Mäusen ist der MMR-spezifische G2/M-Arrest in Zellen dieser ebenfalls messbar eingeschränkt (Chen et al. 2005). In humanen somatischen Zellen sind dagegen die Funktion der Endonukleasedomäne von MLH3 und eine redundante Funktion zu MutLα in MMR nicht nachweisbar.

4.8 Abschließende Betrachtung

Nach der Etablierung eines Untersuchungssystems in humanen Zellen kann in dieser Arbeit eine Funktion von MLH3 in der Antwort von DNA-Reparaturproteinen auf DNA-Schäden gezeigt werden. Diese Akkumulation an DNA-Läsionen ist zellzyklusunabhängig, erfolgt ohne ATP-Verbrauch und ist nicht zwingend mit der Aktivität der intrinsischen Endonuklease verknüpft. Daher wird als Antwort auf UV-induzierte DNA-Schäden von einer allgemeinen Rekrutierung MutL-homologer Proteine ausgegangen. Die Unabhängigkeit von der Heterodimerisierung mit MLH1 kann durch Hinweise auf die Bildung von MLH3-Homodimeren erklärt werden.

Weiterhin wurde aufgrund entsprechender Beobachtungen in murinen Zellen untersucht, inwiefern MutL γ in humaner MMR involviert ist. Es kann gezeigt werden, dass MLH3 Fehlpaarungen der DNA nicht prozessiert. Obwohl das Protein alle Motive einer funktionalen Endonuklease aufweist, kann in humanen Zellen keine Reparaturaktivität nachgewiesen werden. Somit ist eine Redundanz von MutL γ und MutL α in Bezug auf MMR und die Möglichkeit eines Backup-Systems in humanen Zellen nicht nachweisbar.

Bekannte Funktionen von MLH3 in der Meiose beruhen jedoch auf der Aktivität der Endonuklease. Es wird vermutet, dass MutL γ neben der Initiation und Stabilisierung von crossing-over-Ereignissen auch in die Auflösung der Holliday-Strukturen involviert ist (Nishant et al. 2008). Es ist daher nicht auszuschließen, dass für die enzymatische Funktion von MLH3 eine Einbindung in ein Holliday-Struktur-Intermediat der Meiose zugrunde liegen muss.

Zusammenfassung

Mutationen der humanen Mismatch-Reparaturgene stellen die Ursache der erblichen Darmkrebsform Lynch Syndrom/HNPCC dar. Mismatch-Reparatur (MMR) erkennt und korrigiert post-replikativ Fehler in der DNA-Sequenz, wobei die Detektion der Fehler durch die Proteinheterodimere MutS α und β , sowie das Einschneiden des fehlerhaften Strangs durch MutL α , essentielle Schritte der Reparatur darstellen. Den darüberhinaus bekannten Proteinheterodimeren der MMR-Familie MutS γ (MSH4/MSH5) und MutL γ (MLH1/MLH3), werden in humanen Zellen dagegen Funktionen in der Meiose und in crossing-over-Ereignissen zugeschrieben. Arbeiten mit MMR-spezifischen Knockout-Mäusen zeigen, dass diese γ -Heterodimere einen Funktionsverlust der α/β -Heterodimere kompensieren können und so ein Backup-System darstellen. In humanen Zellen konnte diese Redundanz bisher nicht gezeigt werden, obwohl hohe Sequenzhomologien innerhalb der MMR-Proteindimere vorliegen.

Die Nicht-Verfügbarkeit funktionaler Antikörper und geeigneter humaner Modellsysteme haben die Untersuchung der γ -Heterodimere bisher erschwert. Eine im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Transkriptanalyse an humanen Tumorzelllinien, die Defekte der α/β -Heterodimere aufweisen, lieferte keinen eindeutigen Hinweis auf ein redundantes System. Daraufhin wurde erstmals erfolgreich ein stabil exprimierendes Untersuchungssystem für MutS γ und MutL γ etabliert. Die Fusion mit Fluoreszenzproteinen ermöglichte eine Untersuchung der Funktion der γ -Heterodimere *in vivo* in humanen Zellen. Nach Induktion von DNA-Schäden durch laservermittelte UVA-Strahlung, wurde eine Akkumulation von MLH3 mittels *live cell imaging* beobachtet.

Eine Funktion von MutL γ in MMR wurde anhand der Auslösung eines spezifischen Zellzyklusarrests, der aus aktiver Reparatur resultiert, untersucht. Dazu wurden Einzelklone der MMR-defizienten Zelllinie 293T, die durch rekombinante Expression von MutL α oder MutL γ rekonstituiert wurden, vergleichend eingesetzt. Während über die Expression von MutL α die Reparaturfunktion und die Auslösung des Zellzyklusarrests wiederhergestellt werden konnte, konnte nach Expression von MutL γ kein Einfluss auf den Zellzyklus detektiert werden. Die Experimente zeigen eindeutig, dass MutL γ in humanen Zellen am Mismatch-Reparatur-ausgelösten Zellzyklusarrest nicht beteiligt ist. Im Gegensatz zu murinen Zellen sind daher eine Redundanz zu MutL α sowie eine Backup-Funktion durch das γ -Heterodimer in humanen Zellen nicht nachweisbar.

Literaturverzeichnis

- Akiyama Y, Nagasaki H, Nakajima T, Sakai H, Nomizu T, Yuasa Y. Infrequent frameshift mutations in the simple repeat sequences of hMLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31(2): 61-64.
- Amin N S, Nguyen M N, Oh S, Kolodner R D. exo1-Dependent mutator mutations: model system for studying functional interactions in mismatch repair. *Mol Cell Biol* 2001; 21(15): 5142-5155.
- Baerenfaller K, Fischer F, Jiricny J. Characterization of the "mismatch repairosome" and its role in the processing of modified nucleosides in vitro. *Methods Enzymol* 2006; 408: 285-303.
- Ban C, Junop M, Yang W. Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* 1999; 97(1): 85-97.
- Batista L F, Roos W P, Kaina B, Menck C F. p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. *Mol Cancer Res* 2009; 7(2): 237-246.
- Bellizzi A M, Frankel W L. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol* 2009; 16(6): 405-417.
- Berardini M, Mazurek A, Fishel R. The effect of O6-methylguanine DNA adducts on the adenosine nucleotide switch functions of hMSH2-hMSH6 and hMSH2-hMSH3. *J Biol Chem* 2000; 275(36): 27851-27857.
- Bocker T, Barusevicius A, Snowden T, Rasio D, Guerrette S, Robbins D, Schmidt C, Burczak J, Croce C M, Copeland T, Kovatich A J, Fishel R. hMSH5: a human MutS homologue that forms a novel heterodimer with hMSH4 and is expressed during spermatogenesis. *Cancer Res* 1999; 59(4): 816-822.
- Brieger A, Plotz G, Raedle J, Weber N, Baum W, Caspary W F, Zeuzem S, Trojan J. Characterization of the nuclear import of human MutLalpha. *Mol Carcinog* 2005; 43(1): 51-58.
- Calin G, Herlea V, Barbanti-Brodano G, Negrini M. The coding region of the Bloom syndrome BLM gene and of the CBL proto-oncogene is mutated in genetically unstable sporadic gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 1998; 58(17): 3777-3781.
- Campbell M R, Wang Y, Andrew S E, Liu Y. Msh2 deficiency leads to chromosomal abnormalities, centrosome amplification, and telomere capping defect. *Oncogene* 2006; 25(17): 2531-2536.
- Cannavo E, Marra G, Sabates-Bellver J, Menigatti M, Lipkin S M, Fischer F, Cejka P, Jiricny J. Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Research* 2005; 65(23): 10759-10766.
- Cannavo E, Gerrits B, Marra G, Schlapbach R, Jiricny J. Characterization of the interactome of the human MutL homologues MLH1, PMS1, and PMS2. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(5): 2976-2986.

- Cejka P, Stojic L, Mojas N, Russell A M, Heinimann K, Cannavo E, Di P M, Marra G, Jiricny J. Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *EMBO J* 2003; 22(9): 2245-2254.
- Cejka P, Jiricny J. Interplay of DNA repair pathways controls methylation damage toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2008.
- Charbonneau N, Amunugama R, Schmutte C, Yoder K, Fishel R. Evidence that hMLH3 functions primarily in meiosis and in hMSH2-hMSH3 mismatch repair. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(14): 1411-1420.
- Chen P C, Dudley S, Hagen W, Dizon D, Paxton L, Reichow D, Yoon S R, Yang K, Arnheim N, Liskay R M, Lipkin S M. Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse. *Cancer Res* 2005; 65(19): 8662-8670.
- Chen P C, Kuraguchi M, Velasquez J, Wang Y, Yang K, Edwards R, Gillen D, Edelmann W, Kucherlapati R, Lipkin S M. Novel roles for MLH3 deficiency and TLE6-like amplification in DNA mismatch repair-deficient gastrointestinal tumorigenesis and progression. *PLoS Genet* 2008; 4(6): e1000092.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-159.
- de Jong M M, Hofstra R M, Kooi K A, Westra J L, Berends M J, Wu Y, Hollema H, van der S T, van der Graaf W T, de Vries E G, Schaapveld M, Sijmons R H, te Meerman G J, Kleibeuker J H. No association between two MLH3 variants (S845G and P844L) and colorectal cancer risk. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 152(1): 70-71.
- de B J, Hoeijmakers J H. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 453-460.
- De B R, Van L N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004; 19(3): 169-185.
- Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Bouvier R, Berger F, Bouras M, Droz J P, Benahmed M. Expression of hMLH1 and hMSH2 and assessment of microsatellite instability in testicular and mediastinal germ cell tumours. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(12): 1099-1105.
- Dirks W, Wirth M, Hauser H. Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. *Gene* 1993; 128(2): 247-249.
- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* 2003; 42(30): 9221-9226.
- DuBridge R B, Tang P, Hsia H C, Leong P M, Miller J H, Calos M P. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 1987; 7(1): 379-387.

- Duckett D R, Drummond J T, Murchie A I H, Reardon J T, Sancar A, Lilley D M, Modrich P. Human MutS alpha recognizes damaged DNA base pairs containing O-6-methylguanine, O-4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(13): 6443-6447.
- Dufner P, Marra G, Raschle M, Jiricny J. Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutS alpha is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(47): 36550-36555.
- Dundr M, Misteli T. Measuring Dynamics of Nuclear Proteins by Photobleaching. In: *Current Protocols in Cell Biology*. Wiley Interscience, 2003; Organelle motility: supplement 18.
- Dutta R, Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(1): 24-28.
- Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002; 62(9): 2447-2454.
- Dzantiev L, Constantin N, Genschel J, Iyer R R, Burgers P M, Modrich P. Defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Molecular Cell* 2004; 15(1): 31-41.
- Ersoy I, Bunyak F, Chagin V, Cardoso M C, Palaniappan K. Segmentation and Classification of Cell Cycle Phases in Fluorescence Imaging. *Lect Notes Comput Sci* 2009; 5762: 617-624.
- Essers J, Theil A F, Baldeyron C, van Cappellen W A, Houtsmuller A B, Kanaar R, Vermeulen W. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol* 2005; 25(21): 9350-9359.
- Fishel R. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes Dev* 1998; 12(14): 2096-2101.
- Flores-Rozas H, Kolodner R D. The *Saccharomyces cerevisiae* MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(21): 12404-12409.
- Flores-Rozas H, Clark D, Kolodner R D. Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex. *Nat Genet* 2000; 26(3): 375-378.
- Geissler S, Siegers K, Schiebel E. A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *EMBO J* 1998; 17(4): 952-966.
- Genschel J, Littman S J, Drummond J T, Modrich P. Isolation of MutS beta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS beta and MutS alpha. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(31): 19895-19901.
- Gradia S, Acharya S, Fishel R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 1997; 91(7): 995-1005.

- Guarne A, Junop M S, Yang W. Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase. *EMBO J* 2001; 20(19): 5521-5531.
- Guo S, Zhang Y, Yuan F, Gao Y, Gu L, Wong I, Li G M. Regulation of replication protein A functions in DNA mismatch repair by phosphorylation. *J Biol Chem* 2006; 281(31): 21607-21616.
- Hartlerode A J, Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* 2009; 423(2): 157-168.
- Helleday T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis* 2010; 31(6): 955-960.
- Her C, Doggett N A. Cloning, structural characterization, and chromosomal localization of the human orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics* 1998; 52(1): 50-61.
- Her C, Wu X, Griswold M D, Zhou F. Human MutS homologue MSH4 physically interacts with von Hippel-Lindau tumor suppressor-binding protein 1. *Cancer Res* 2003; 63(4): 865-872.
- Hernandez-Pigeon H, Laurent G, Humbert O, Salles B, Lautier D. Degradation of mismatch repair hMutS α heterodimer by the ubiquitin-proteasome pathway. *FEBS Lett* 2004; 562(1-3): 40-44.
- Hienonen T, Laiho P, Salovaara R, Mecklin J P, Jarvinen H, Sistonen P, Peltomaki P, Lehtonen R, Nupponen N N, Launonen V, Karhu A, Aaltonen L A. Little evidence for involvement of MLH3 in colorectal cancer predisposition. *Int J Cancer* 2003; 106(2): 292-296.
- Hong Z, Jiang J, Hashiguchi K, Hoshi M, Lan L, Yasui A. Recruitment of mismatch repair proteins to the site of DNA damage in human cells. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 19): 3146-3154.
- Huang J, Zheng S, Jin S H, Zhang S Z. Somatic mutations of APC gene in carcinomas from hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2004; 10(6): 834-836.
- Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(1): 11-16.
- Jacobs J P, Jones C M, Baille J P. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 1970; 227(5254): 168-170.
- Jiricny J, Marra G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(1): 61-69.
- Jiricny J. MutL α : at the cutting edge of mismatch repair. *Cell* 2006; 126(2): 239-241.
- Johnson J R, Erdeniz N, Nguyen M, Dudley S, Liskay R M. Conservation of functional asymmetry in the mammalian MutL α ATPase. *DNA Repair (Amst)* 2010; 9(11): 1209-1213.

- Kadyrov F A, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutL alpha in human mismatch repair. *Cell* 2006; 126(2): 297-308.
- Kan R, Sun X, Kolas N K, Avdievich E, Kneitz B, Edelmann W, Cohen P E. Comparative analysis of meiotic progression in female mice bearing mutations in genes of the DNA mismatch repair pathway. *Biol Reprod* 2008; 78(3): 462-471.
- Karran P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* 2001; 22(12): 1931-1937.
- Kim N G, Rhee H, Li L S, Kim H, Lee J S, Kim J H, Kim N K, Kim H. Identification of MARCKS, FLJ11383 and TAF1B as putative novel target genes in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Oncogene* 2002; 21(33): 5081-5087.
- Kleczkowska H E, Marra G, Lettieri T, Jiricny J. hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. *Genes Dev* 2001; 15(6): 724-736.
- Kloor M, Michel S, von Knebel D M. Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *Int J Cancer* 2010; 127(5): 1001-1010.
- Kolas N K, Cohen P E. Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination. *Cytogenet Genome Res* 2004; 107(3-4): 216-231.
- Kolas N K, Svetlanov A, Lenzi M L, Macaluso F P, Lipkin S M, Liskay R M, Greally J, Edelmann W, Cohen P E. Localization of MMR proteins on meiotic chromosomes in mice indicates distinct functions during prophase I. *J Cell Biol* 2005; 171(3): 447-458.
- Kondo E, Horii A, Fukushige S. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(8): 1695-1702.
- Kosinski J, Plotz G, Guarne A, Bujnicki J M, Friedhoff P. The PMS2 Subunit of Human MutLalpha Contains a Metal-Ion-Binding Domain of the Iron-Dependent Repressor Protein Family. *J Mol Biol* 2008.
- Kwon M, Godinho S A, Chandhok N S, Ganem N J, Azione A, Thery M, Pellman D. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev* 2008; 22(16): 2189-2203.
- Lan L, Nakajima S, Oohata Y, Takao M, Okano S, Masutani M, Wilson S H, Yasui A. In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(38): 13738-13743.
- Lange S S, Vasquez K M. HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. *Mol Carcinog* 2009; 48(7): 571-580.
- Li G M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 2008; 18(1): 85-98.
- Lipkin S M, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis A D, Lynch H T, Elliott R M, Collins F S. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nature Genetics* 2000; 24(1): 27-35.

- Lipkin S M, Wang V, Stoler D L, Anderson G R, Kirsch I, Hadley D, Lynch H T, Collins F S. Germline and somatic mutation analyses in the DNA mismatch repair gene MLH3: Evidence for somatic mutation in colorectal cancers. *Hum Mutat* 2001; 17(5): 389-396.
- Lipkin S M, Moens P B, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, Thomas J, Cheng J, Touchman J W, Green E D, Schwartzberg P, Collins F S, Cohen P E. Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet* 2002; 31(4): 385-390.
- Liu H X, Zhou X L, Liu T, Werelius B, Lindmark G, Dahl N, Lindblom A. The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. *Cancer Res* 2003; 63(8): 1894-1899.
- Loeb L A, Springgate C F, Battula N. Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res* 1974; 34(9): 2311-2321.
- Loechler E L, Green C L, Essigmann J M. In vivo mutagenesis by O6-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 81: 6271-6275.
- Loukola A, Vilkkil S, Singh J, Launonen V, Aaltonen L A. Germline and somatic mutation analysis of MLH3 in MSI-positive colorectal cancer. *Am J Pathol* 2000; 157(2): 347-352.
- Lynch H T, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer* 1996; 78(6): 1149-1167.
- Marnett L J, Plastaras J P. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet* 2001; 17(4): 214-221.
- Mironov N, Jansen L A, Zhu W B, Aguelon A M, Reguer G, Yamasaki H. A novel sensitive method to detect frameshift mutations in exonic repeat sequences of cancer-related genes. *Carcinogenesis* 1999; 20(11): 2189-2192.
- Mirzoeva O K, Kawaguchi T, Pieper R O. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex interacts with the mismatch repair system and contributes to temozolomide-induced G(2) arrest and cytotoxicity. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; 5(11): 2757-2766.
- Misteli T, Soutoglou E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(4): 243-254.
- Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 101-133.
- Moens P B, Kolas N K, Tarsounas M, Marcon E, Cohen P E, Spyropoulos B. The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 8): 1611-1622.
- Mojas N, Lopes M, Jiricny J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev* 2007; 21(24): 3342-3355.

- Mori Y, Yin J, Rashid A, Leggett B A, Young J, Simms L, Kuehl P M, Langenberg P, Meltzer S J, Stine O C. Instabilotyping: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61(16): 6046-6049.
- Mortusewicz O, Leonhardt H. XRCC1 and PCNA are loading platforms with distinct kinetic properties and different capacities to respond to multiple DNA lesions. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 81.
- Mortusewicz O, Roth W, Li N, Cardoso M C, Meisterernst M, Leonhardt H. Recruitment of RNA polymerase II cofactor PC4 to DNA damage sites. *J Cell Biol* 2008; 183(5): 769-776.
- Nigg E A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2002; 2(11): 815-825.
- Nishant K T, Plys A J, Alani E. A Mutation in the Putative MLH3 Endonuclease Domain Confers a Defect in Both Mismatch Repair and Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2008; 179(2): 747-755.
- Nospikel T. Nucleotide excision repair and neurological diseases. *DNA Repair (Amst)* 2008; 7(7): 1155-1167.
- Obmolova G, Ban C, Hsieh P, Yang W. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* 2000; 407(6805): 703-710.
- Oliver-Bonet M, Turek P J, Sun F, Ko E, Martin R H. Temporal progression of recombination in human males. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(7): 517-522.
- Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123(1): 291-298.
- Otsuka K, Suzuki T, Shibata H, Kato S, Sakayori M, Shimodaira H, Kanamaru R, Ishioka C. Analysis of the human APC mutation spectrum in a *saccharomyces cerevisiae* strain with a mismatch repair defect. *Int J Cancer* 2003; 103(5): 624-630.
- Ou J, Rasmussen M, Westers H, Andersen S D, Jager P O, Kooi K A, Niessen R C, Eggen B J, Nielsen F C, Kleibeuker J H, Sijmons R H, Rasmussen L J, Hofstra R M. Biochemical characterization of MLH3 missense mutations does not reveal an apparent role of MLH3 in Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48(4): 340-350.
- Paquis-Flucklinger V, Santucci-Darmanin S, Paul R, Saunieres A, Turc-Carel C, Desnuelle C. Cloning and expression analysis of a meiosis-specific MutS homolog: the human MSH4 gene. *Genomics* 1997; 44(2): 188-194.
- Park J, Betel D, Gryfe R, Michalickova K, Di N N, Gallinger S, Hogue C W, Redston M. Mutation profiling of mismatch repair-deficient colorectal cancers using an in silico genome scan to identify coding microsatellites. *Cancer Res* 2002; 62(5): 1284-1288.
- Phair R D, Misteli T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 2000; 404(6778): 604-609.

- Pollycove M, Feinendegen L E. Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage. *Hum Exp Toxicol* 2003; 22(6): 290-306.
- Quiros S, Roos W P, Kaina B. Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle* 2010; 9(1): 168-178.
- Raschle M, Marra G, Nystrom-Lahti M, Schar P, Jiricny J. Identification of hMutL beta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(45): 32368-32375.
- Reitmair A H, Cai J C, Bjerknes M, Redston M, Cheng H, Pind M T, Hay K, Mitri A, Bapat B V, Mak T W, Gallinger S. MSH2 deficiency contributes to accelerated APC-mediated intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 1996; 56(13): 2922-2926.
- Robertson A B, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(6): 981-993.
- Santucci-Darmanin S, Paul R, Michiels J F, Saunieres A, Desnuelle C, Paquis-Flucklinger V. Alternative splicing of hMSH4: two isoforms in testis and abnormal transcripts in somatic tissues. *Mamm Genome* 1999; 10(4): 423-427.
- Santucci-Darmanin S, Walpita D, Lespinasse F, Desnuelle C, Ashley T, Paquis-Flucklinger V. MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis. *FASEB J* 2000; 14(11): 1539-1547.
- Santucci-Darmanin S, Neyton S, Lespinasse F, Saunieres A, Gaudray P, Paquis-Flucklinger V. The DNA mismatch-repair MLH3 protein interacts with MSH4 in meiotic cells, supporting a role for this MutL homolog in mammalian meiotic recombination. *Human Molecular Genetics* 2002; 11(15): 1697-1706.
- Schermelleh L, Spada F, Easwaran H P, Zolghadr K, Margot J B, Cardoso M C, Leonhardt H. Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells. *Nat Methods* 2005; 2(10): 751-756.
- Sedgwick B, Lindahl T. Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. *Oncogene* 2002; 21(58): 8886-8894.
- Shaner N C, Lin M Z, McKeown M R, Steinbach P A, Hazelwood K L, Davidson M W, Tsien R Y. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 2008; 5(6): 545-551.
- Shimada M, Komatsu K. Emerging connection between centrosome and DNA repair machinery. *J Radiat Res (Tokyo)* 2009; 50(4): 295-301.
- Shrivastav M, De Haro L P, Nickoloff J A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 2008; 18(1): 134-147.
- Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1): 184-191.

- Snapp E, Altan N, Lippincott-Schwartz J. Measuring Protein Mobility by Photobleaching GFP Chimeras in Living Cells. In: *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, 2003; 2003: Supplemental 19.
- Snowden T, Acharya S, Butz C, Berardini M, Fishel R. hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell* 2004; 15(3): 437-451.
- Sporbert A, Domaing P, Leonhardt H, Cardoso M C. PCNA acts as a stationary loading platform for transiently interacting Okazaki fragment maturation proteins. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(11): 3521-3528.
- Stojic L, Mojas N, Cejka P, Di P M, Ferrari S, Marra G, Jiricny J. Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. *Genes Dev* 2004; 18(11): 1331-1344.
- Stojic L, Cejka P, Jiricny J. High doses of SN1 type methylating agents activate DNA damage signaling cascades that are largely independent of mismatch repair. *Cell Cycle* 2005; 4(3): 473-477.
- Tompkins J D, Wu X, Chu Y L, Her C. Evidence for a direct involvement of hMSH5 in promoting ionizing radiation induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2009; 315(14): 2420-2432.
- Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, Plotz G, Jiricny J, Marra G. Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* 2002; 122(1): 211-219.
- Umar A, Kunkel T A. DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur J Biochem* 1996; 238(2): 297-307.
- Velasco A, Riquelme E, Schultz M, Wistuba I I, Villarroel L, Pizarro J, Berlin A, Ittmann M, Koh M S, Leach F S. Mismatch repair gene expression and genetic instability in testicular germ cell tumor. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(10): 977-982.
- Verkman A S. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(1): 27-33.
- Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med* 1913;12:546-555.
- Wei K, Clark A B, Wong E, Kane M F, Mazur D J, Parris T, Kolas N K, Russell R, Hou H, Jr., Kneitz B, Yang G, Kunkel T A, Kolodner R D, Cohen P E, Edelmann W. Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Dev* 2003; 17(5): 603-614.
- Winand N J, Panzer J A, Kolodner R D. Cloning and characterization of the human and *Caenorhabditis elegans* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics* 1998; 53(1): 69-80.

- Woerner S M, Gebert J, Yuan Y P, Sutter C, Ridder R, Bork P, von Knebel D M. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 93(1): 12-19.
- Wu X S, Platt J L, Cascalho M. Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutL alpha. *Molecular and Cellular Biology* 2003; 23(9): 3320-3328.
- Wu Y, Berends M J, Sijmons R H, Mensink R G, Verlind E, Kooi K A, van der S T, Kempinga C, van dDer Zee A G, Hollema H, Buys C H, Kleibeuker J H, Hofstra R M. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 2001; 29(2): 137-138.
- Yi W, Wu X, Lee T H, Doggett N A, Her C. Two variants of MutS homolog hMSH5: prevalence in humans and effects on protein interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332(2): 524-532.
- York S J, Modrich P. Mismatch repair-dependent iterative excision at irreparable O-6-methylguanine lesions in human nuclear extracts. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(32): 22674-22683.
- Yoshioka K, Yoshioka Y, Hsieh P. ATR kinase activation mediated by MutS alpha and MutL alpha in response to cytotoxic O-6-methylguanine adducts. *Molecular Cell* 2006; 22(4): 501-510.
- Yuan F, Gu L, Guo S, Wang C, Li G M. Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair. *J Biol Chem* 2004; 279(20): 20935-20940.
- Zhang Y, Yuan F, Presnell S R, Tian K, Gao Y, Tomkinson A E, Gu L, Li G M. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell* 2005; 122(5): 693-705.
- Zhou B, Huang C, Yang J, Lu J, Dong Q, Sun L Z. Preparation of heteroduplex enhanced green fluorescent protein plasmid for in vivo mismatch repair activity assay. *Anal Biochem* 2009; 388(1): 167-169.

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen meiner Tätigkeit als Doktorand in der Abteilung Menschliche und Tierische Zellkulturen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig entstanden.

Meinen besonderen Dank möchte ich Dr. Willy Dirks, Arbeitsgruppenleiter der AG Molekularbiologie an der DSMZ, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung als Doktorvater und die gute Ausbildung aussprechen.

Darüber hinaus danke ich PD Dr. Gerhard Gross vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig für die Bereitschaft, die Aufgabe des Mentors und Referenten zu übernehmen. Prof. Dr. Norbert F. Käufer, Vorstand des Instituts für Genetik an der Technischen Universität Braunschweig, danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Kurt E.D. Dittmar und der Abteilung RDIF des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig, danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des konfokalen Mikroskops sowie die freundliche Einarbeitung.

Dr. Christian Mielke von der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit sowie für seine Hilfestellung bei der Etablierung des Experiments zur laservermittelten Induktion von DNA-Schäden.

Weiterhin möchte ich mich für die spontante Unterstützung am konfokalen Mikroskop bei Prof. Dr. Robert Hänsch vom Institut für Pflanzenbiologie der Technischen Universität Braunschweig bedanken.

Prof. Dr. Erko Stackebrandt, Prof. Dr. Jörg Overmann und Prof. Dr. Hans G. Drexler von der DSMZ danke ich für den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz. Allen meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie für das hervorragende Arbeitsklima. Für die tolle Atmosphäre in der Arbeitsgruppe gilt mein besonderer Dank Silke Fährnich und Yvonne Merkhoffer.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Susanne, bei meinen Eltern, meinen Schwestern und meinen Freunden für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und den sicheren Rückhalt in allen Phasen der Arbeit bedanken.